



PROGRAMA DE DOCTORADO:

BIOLOGÍA MOLECULAR, BIOMEDICINA E INVESTIGACIÓN CLÍNICA

LÍNEA DE INVESTIGACIÓN: INVESTIGACIÓN CLÍNICA

**ASOCIACIÓN DE POLIMORFISMOS DE NUCLEÓTIDO SIMPLE DE
TGF- β 1 Y HSP- β 1 CON LA SUPERVIVENCIA Y VALIDACIÓN
PROSPECTIVA DEL RIESGO DE ESOFAGITIS EN PACIENTES CON
CÁNCER DE PULMÓN**

TESIS DOCTORAL PRESENTADA POR

BLAS DAVID DELGADO LEÓN

DIRECTORES:

MARÍA JOSÉ ORTÍZ GORDILLO; JUAN CARLOS MATEOS PÉREZ; JOSÉ LUIS LÓPEZ GUERRA.

TUTOR:

FRANCISCO JAVIER MIÑANO SÁNCHEZ.

SEVILLA, 2019

A MI MADRE.

AGRADECIMIENTOS

Quisiera expresar en primer lugar mi agradecimiento más sincero a mi Tutor de Tesis, el Profesor Francisco Javier Miñano Sánchez, por su atención y empeño en que se desarrollara este proyecto de tesis.

A mi tutor el Dr. José Luis López Guerra por sus acertadas directrices durante todo el desarrollo de este trabajo. Quiero agradecer su generosidad, paciencia y entusiasmo en los momentos más complicados, así como, reconocer su gran experiencia clínica e investigadora, por su seguridad y confianza que sólo el conocimiento te puede conceder. Gracias por su tiempo, ayuda y sobretodo, por su amistad.

A mis otros directores el profesor Juan Carlos Mateos y la Dra. María José Ortiz Gordillo maestros de la vida y del ejercicio profesional, que me han acompañado y aconsejado con gran confianza y estima en mi desarrollo profesional.

Al Servicio de Oncología Radioterápica del H.G.U. Gregorio Marañón, Centro donde realicé mi Residencia. A la Dra. Carmen González San Segundo por su gran capacidad docente durante mi formación como oncólogo radioterápico, a pesar de su incesante labor asistencial, por contagiarme el amor por la especialidad y el respeto por el paciente, su afán por avanzar profesionalmente y el valor del trabajo bien hecho, por ser un ejemplo a seguir, por su cariño en los momentos probablemente más difíciles de mi vida y por su sincera amistad.

Al profesor Ferrán Guedea Edo quien me dio la oportunidad de iniciar mi andadura como Especialista en el I.C.O. de Barcelona, donde pude aprender tanto gracias al gran equipo humano y profesional.

A mi familia, por todos estos años de esfuerzo personal, por ayudarme a ser lo que soy, gracias a ellos hoy esta tesis es una realidad. A Irene, mi corazón, por su demostración constante de madurez. A Juan Manuel, por su cariño y comprensión, su constante optimismo, por instarme siempre a desarrollarme personal y profesionalmente, por sus horas robadas, por los cafés de más y las sonrisas de menos, y por su incondicional apoyo en los momentos más desfavorables.

A mis pacientes, eje principal de mi día a día. Gracias por enseñarme tanto y pedirme tan poco.

*“Aprender sin pensar es inútil,
Pensar sin aprender es peligroso”*

Confucio.

ABREVIATURAS

AJCC: American Joint Committee on Cancer

ASTRO: Sociedad Americana de Oncología Radioterápica

AUC: Área Bajo la Curva

BED: Dosis Biológica Equivalente

CC: Centímetros Cúbicos

CRT: Químio-Radioterapia

CT: Tomografía Computarizada

CTV: Clinical Target Volume

CTCAE: Common Terminology Criteria for Adverse Events

Dmax: Dosis Máxima

Dmin: Dosis Mínima

DNA: Deoxyribonucleic Acid, Ácido Desoxirribonucleico

EBUS: Ecografía Endobronquial

EGFR, ERBB-1: Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico

EUD: Dosis Uniforme Equivalente

FEV1: Volumen Espiratorio Forzado en el Primer Segundo

GC: Glucocorticoides

GST: Genes Supresores De Tumores

GTV: Gross Tumor Volume

Gy: Gray

HR: Hazard Ratio

HSP: Proteína de Choque Térmico HSP- β 1, HSPB1: Gen de la Proteína de Choque Térmico Beta-1

IASCLC: International Association for the Study of Lung Cancer

IBP: Inhibidores de la Bomba de Protones

IC: Intervalo de Confianza

ICP: Irradiación Craneal Profiláctica

ICRU: International Commission on Radiation Units and Measurements

IGRT: Radioterapia Guiada por la Imagen

IMRT: Radioterapia de Intensidad Modulada

KPS: Karnofsky Performance Status

MAF: Frecuencia del Alelo Menor

MED: Dosis Media de Esófago

NSCLC: Cáncer de Pulmón No Célula Pequeña

NOS: No Especificado

OAR: Órganos de Riesgo

OMS: Organización Mundial de la Salud

PCI: Radioterapia Holocraneal Profiláctica, Prophylactic Cranial Irradiation

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa

PET: Tomografía por Emisión de Positrones

PTV: Planning Target Volume

QT: Quimioterapia

QUANTEC: Quantitative Analyses of Normal Tissue Effects in the Clinic

RB: Retinoblastoma

RG: Receptor de Glucocorticoides

RIET: Esofagitis Inducida por Radioterapia

RT: Radioterapia

RTC3D: Radioterapia Conformada Tridimensional

RTOG: Radiation Therapy Oncology Group

SABR: Radioterapia Estereotáctica Ablativa

SBRT: Radioterapia Estereotáctica Extracraneal

SCLC: Cáncer de Pulmón de Célula Pequeña, Small Cell Lung Cancer

SG: Supervivencia Global

SLE: Supervivencia Libre de Enfermedad

SLRD: Supervivencia libre de recurrencia a distancia

SLRLR: Supervivencia Libre de Recurrencia Loco-Regional

SNP: Polimorfismo de un Solo Nucleótido

TGF- β 1, TGFB1: Factor de Crecimiento Transformante β 1

TKI: Inhibidores de la enzima Tirosina quinasa

UH: Unidades Hounsfield

V_x: Volumen de un Órgano Sano que recibe X Gy o más.

VALSG: Veterans Administration Lung Study Group

VMAT: Arcoterapia Volumétrica de Intensidad Modulada

R ESUMEN

Hipótesis y Objetivos: los genes TGF- β 1 y HSP- β 1 pueden estar asociados al desarrollo de eventos adversos secundarios a los tratamientos y/o la supervivencia de pacientes con cáncer de pulmón (CP). Estas predicciones con base genética ayudarían a la mejora de la efectividad de los tratamientos en términos de seguridad y supervivencia.

Pacientes y Métodos: se diseñó un estudio prospectivo y multicéntrico (5 instituciones) reclutando 247 pacientes diagnosticados de CP (cualquier histología) entre 2012 y 2016 tratados con radioterapia y quimioterapia. Se realizó el genotipado de SNPs de los genes TGF- β 1 y HSP- β 1. Se analizó su asociación con el riesgo de esofagitis rádica (RIET) aguda y/o crónica, así como su impacto en la supervivencia de los pacientes. Se realizó validación prospectiva de nuestra cohorte mediante 2 series publicadas anteriormente (Guo et al. y Xu et al).

Resultados: el análisis multivariante para la evaluación de la supervivencia reflejó que el SNP rs7459185 se asociaba a una peor SLE en pacientes diagnosticados de NSCLC ($p = 0.016$). El análisis de supervivencia global demostró que pacientes con SCLC y con el genotipo rs7459185 CC del gen HSP- β 1 presentaron una peor SG ($p = 0.011$).

En cuanto a la toxicidad esofágica, el análisis multivariante mostró que los pacientes portadores del genotipo HSP- β 1 rs7459185 CC se asociaron a un riesgo mayor de RIET agudo grado 3 (HR = 17.73; IC 95% = 2.896-108.49; $p = 0.002$). Aquellos pacientes que recibieron mayor de 30 Gy en el esófago y eran portadores de los genotipos rs7459185 GG/GC presentaron una disminución estadísticamente significativa en la incidencia de RIET aguda grado 3 ($p < 0.001$). Además, el genotipo

rs11466353 GG del gen TGF- β 1 en los pacientes con CP se asoció con un menor riesgo de RIET tardía grado 2 ($p = 0.021$). Los pacientes que recibieron una dosis radical de radiación (> 60 Gy) y eran portadores del genotipo rs11466353 GG presentaron una incidencia de RIET crónica grado 2 significativamente menor ($p = 0,025$).

Conclusión: La presencia de determinados genotipos en rs7459185 (HSP- β 1) y rs11466353 (TGF- β 1) en pacientes con CP pueden ser biomarcadores predictivos de respuesta a los tratamientos en términos de supervivencia y toxicidad. Los resultados de nuestro estudio, podrían implementar el tratamiento personalizado en los pacientes con cáncer de pulmón.

ÍNDICE

1.- Introducción	1
1.1.- Estadificación TNM 8ª Edición	4
1.2.- Etiología del Cáncer de Pulmón.....	10
1.3.- Factores Moleculares.....	12
1.4.- Tratamiento de Radioterapia.....	17
1.5.- Toxicidad de Órganos Sanos.....	19
1.6.- Esofagitis Rádica	20
1.6.1.- Fisiopatología	21
1.6.2.- Síntomas	21
1.6.3.- Factores de Riesgo	23
1.6.4.- Prevención.....	28
1.6.5.- Diagnóstico.....	33
1.6.6.- Manejo.....	33
1.7.- Polimorfismos de Nucleótido Simple (SNP)	34
1.7.1.- Factor de Crecimiento Transformante- β 1 (TGF- β 1)	36
1.7.2.- Proteínas de Choque Térmico- β 1 (HSP- β 1).....	37
2.- Hipótesis y Objetivos.....	41
3.- Pacientes y Métodos.....	44
3.1.- Declaración Comité de Ética.....	45

3.2.- Selección de Pacientes.....	46
3.2.1.- Criterios de Inclusión	46
3.2.2.- Criterios de Exclusión.....	47
3.2.3.- Variables del Estudio.....	47
3.2.3.1.- Variables Clínicas	48
3.2.3.2.- Variables Terapéuticas	50
3.2.3.3.- Variables Biológicas / Genéticas	51
3.2.3.4.- Variables Temporales.....	51
3.3.- Recogida de Datos	54
3.4.- Planificación en Radioterapia.....	55
3.5.- Evaluación del Paciente y Seguimiento	65
3.6.- Método de Genotipado y Selección de SNPs	66
3.7.- Análisis Estadístico	68
3.8.- Validación Prospectiva del Riesgo de Esofagitis	70
4.- Resultados.....	71
4.1.- Características de los pacientes	72
4.2.- Supervivencia	77
4.2.1.- Correlación entre Supervivencia y SNPs seleccionados	77
4.2.1.1.- Supervivencia Global	78

4.2.1.2.- Supervivencia Libre de Enfermedad	91
4.3.- Toxicidad Esofágica	102
5.- Discusión	124
6.- Conclusiones	135
7.- Bibliografía	138
8.- Anexos	167

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA Nº	DESCRIPCIÓN	PÁGINA
Tabla 1.	Estadíaaje del Cáncer de Pulmón según TNM.	6
Tabla 2.	Agentes emergentes dirigidos para pacientes con alteraciones genéticas en Cáncer de Pulmón.	16
Tabla 3.	Tasas de incidencia de esofagitis aguda con diferentes técnicas de RT de tratamiento para cáncer de pulmón no microcítico.	24
Tabla 4.	Relación entre factores dosimétricos y riesgo de esofagitis según diferentes publicaciones.	26
Tabla 5.	Limitaciones de dosis para esofagitis aguda post-radioterapia.	29
Tabla 6.	Restricciones de dosis para toxicidad esofágica tardía post-radioterapia.	31
Tabla 7.	Criterios de clasificación para esofagitis.	49
Tabla 8.	Definición de volúmenes de tratamiento en radioterapia basados en ICRU-62.	58
Tabla 9.	Restricciones de dosis y volumen en el tejido normal para la RT con fraccionamiento convencional.	64
Tabla 10.	Genes seleccionados y polimorfismos de un solo nucleótido en este estudio.	67
Tabla 11.	Características clínico-patológicas de los pacientes.	72
Tabla 12.	Características dosimétricas de los pacientes.	75
Tabla 13.	Asociación entre características clínico-patológicas y la	78

Supervivencia Global.

Tabla 14.	Asociación entre características dosimétricas relacionadas con el tratamiento radioterápico y la Supervivencia Global.	81
Tabla 15.	Análisis multivariante utilizando un modelo de análisis de riesgos proporcionales de Cox con un procedimiento de eliminación “paso atrás” de factores asociados con la Supervivencia Global.	85
Tabla 16.	Asociación entre características clínico-patológicas de los pacientes y la Supervivencia Libre de Enfermedad.	91
Tabla 17.	Asociación entre características dosimétricas relacionadas con el tratamiento radioterápico y la Supervivencia Libre de Enfermedad.	95
Tabla 18.	Análisis multivariante utilizando un análisis de riesgos proporcionales de Cox con un procedimiento de eliminación “paso atrás” de factores asociados con la Supervivencia Libre de Enfermedad.	98
Tabla 19.	Número de eventos de Esofagitis Rádica Aguda y Crónica según la clasificación CTCAE v4.03.	102
Tabla 20.	Asociaciones entre las características relacionadas con el paciente, el tumor y el tratamiento y la toxicidad esofágica aguda por radioterapia.	109
Tabla 21.	Asociaciones entre las características relacionadas con el paciente, el tumor y el tratamiento y la toxicidad esofágica crónica por radioterapia.	115
Tabla 22.	Análisis multivariante utilizando un análisis de riesgos proporcionales de Cox con un procedimiento de eliminación progresiva “paso atrás” de los factores asociados con la Esofagitis Aguda.	120
Tabla 23.	Análisis multivariante utilizando un análisis de riesgos proporcionales de Cox con un procedimiento de eliminación progresiva “paso atrás” de los factores asociados con la Esofagitis Crónica.	121

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA Nº	DESCRIPCIÓN	PÁGINA
Figura 1.	Clasificación gráfica TNM.	5
Figura 2.	Supervivencia global por Estadio patológico de acuerdo con la séptima edición (A) y la esperada según la octava edición (B) agrupaciones que utilizan toda la base de datos disponible para la octava edición.	9
Figura 3.	Estructura tridimensional del aminoácido Glutamina.	32
Figura 4.	Representación de un SNP.	35
Figura 5.	Estructura terciaria del TGF- β 1.	36
Figura 6.	Estructura tridimensional de HSP 70KDa.	38
Figura 7.	Definición gráfica de las variables temporales de supervivencia.	52
Figura 8.	Sistema de inmovilización para radioterapia torácica.	56
Figura 9.	Recomendaciones ICRU 62 para la definición de volúmenes de tratamiento.	59
Figura 10.	Ejemplo de delimitación de volúmenes de los Órganos de Riesgo según ICRU 62 en un corte del CT de simulación.	60
Figura 11.	Comparación del tiempo de supervivencia entre pacientes SCLC sometidos a cirugía y aquéllos que no fueron intervenidos.	87
Figura 12.	Comparación del tiempo de supervivencia entre pacientes SCLC con KPS \leq 80 % y aquellos con KPS > 80%.	87
Figura 13.	Comparación del tiempo de supervivencia global entre	88

pacientes con SCLC y un PTV ≤ 339.5 cc y aquellos con un volumen de PTV > 339.5 cc.

Figura 14.	Comparación del tiempo de supervivencia global en pacientes SCLC entre pacientes con una dosis mediana de esófago ≤ 21.62 Gy y aquellos con una dosis > 21.62 Gy.	89
Figura 15.	Comparación del tiempo de supervivencia global en pacientes NSCLC entre pacientes con una dosis mediana de esófago ≤ 21.62 Gy y aquellos con una dosis > 21.62 Gy.	89
Figura 16.	Comparación del tiempo de supervivencia global entre pacientes SCLC con genotipos rs7459185 heterocigótico/mutado frente wild type.	90
Figura 17.	Comparación del tiempo de supervivencia libre de enfermedad entre pacientes SCLC que perdieron peso frente aquellos que no lo perdieron.	100
Figura 18.	Comparación del tiempo de supervivencia libre de enfermedad entre pacientes NSCLC sometidos a cirugía y aquellos que no fueron intervenidos.	100
Figura 19.	Comparación del tiempo de supervivencia libre de enfermedad entre pacientes NSCLC con genotipos rs7459185 heterocigótico/mutado frente a wild type.	101
Figura 20.	Curva de Kaplan-Meier para esofagitis aguda inducida por radiación grado 3 en pacientes con cáncer de pulmón portadores de diferentes genotipos del SNP rs7459185.	107
Figura 21.	Curva de Kaplan-Meier para esofagitis tardía inducida por radiación grado 2 en pacientes con cáncer de pulmón portadores de diferentes genotipos del SNP rs11466353.	108
Figura 22.	Curva de Kaplan-Meier para el efecto de los genotipos rs7459185 en pacientes con cáncer de pulmón que reciben V30 alta ($>$ mediana) en la incidencia acumulada	109

de esofagitis aguda inducida por radiación grado 3.

- Figura 23. Curva de Kaplan-Meier para el efecto de los genotipos rs11466353 en pacientes con cáncer de pulmón que reciben dosis de radiación altas (> mediana) en la incidencia acumulativa de esofagitis inducida por radiación grado 2 tardía. 110

NTRODUCCIÓN

El cáncer de pulmón (CP) es la neoplasia maligna con mayor incidencia y la causa más común de muerte por cáncer en las últimas décadas a nivel mundial. Con 2.1 millones de casos nuevos de CP y 1.8 millones de muertes estimadas en 2018, el CP representa cerca de 1 de cada 5 (18.4%) muertes por cáncer (1). Supone la primera causa de muerte por cáncer en varones y la segunda en mujeres (tras el cáncer de mama) en los países de la Unión Europea (2, 3). El 85% de los pacientes diagnosticados de cáncer de pulmón mueren a causa del tumor (1).

De acuerdo con el estudio Global Burden of Disease 2020 (4), la carga de atención médica y los costes atribuidos al CP son muy elevados a escala mundial. Debido a su gran agresividad (5), los patrones de mortalidad del CP siguen de cerca a los de incidencia, y constituye un importante problema de salud pública (6). Con más del 80% de los CP en las poblaciones occidentales atribuidos al tabaquismo, la enfermedad se puede prevenir en gran medida mediante el control del tabaco. La mayoría de países desarrollados han implementado su política social con la adopción de medidas destinadas a la reducción efectiva del hábito tabáquico y la prevención de la exposición involuntaria al humo del tabaco. La mayoría de ellas incluyen, el aumento de los impuestos sobre el consumo y los precios de los productos del tabaco, así como advertencias sanitarias gráficas sobre los productos del tabaco y la aplicación de prohibiciones integrales en la publicidad del tabaco. Todas ellas incorporadas en el Convenio Marco de la OMS para el Control del Tabaco y, tras su adopción en 2003, 168 signatarios han ratificado dicho acuerdo (1).

La incidencia del cáncer de pulmón aumenta con la edad, por lo que a medida que envejece la población cabe anticipar que seguirá aumentando el número de pacientes con este tumor. Su incidencia y mortalidad son muy similares, lo que refleja su mal pronóstico. La incidencia de cáncer de pulmón en mujeres oscila entre 21 y 23 casos por cien mil habitantes al año, cifra que asciende a 39-42 casos por cien mil habitantes al año en varones.

Dadas las tendencias diferenciales por sexo, las tasas en hombres y mujeres están convergiendo en varios países europeos, se postula que es el resultado de las diferencias específicas por sexo en la distribución de los subtipos histológicos, así como la prevalencia del tabaquismo (7). En los Estados Unidos, las tasas de incidencia de cáncer de pulmón son ahora más altas entre las mujeres jóvenes que entre los hombres jóvenes, con patrón limitado a los blancos no hispanos e hispanos; a pesar de describirse de una diferencia específica por sexo en el hábito tabáquico, ésta no se considera como un probable factor etiológico (8).

Las estadísticas de la Unión Europea (UE-27) acerca del cáncer estiman unos 288.100 casos nuevos al año de cáncer de pulmón (de cualquier histología) siendo la tercera localización más común de cáncer (208.220 hombres y 79.900 mujeres). La causa más común de muerte por cáncer es cáncer de pulmón con 252.500 muertes (181.900 hombres y 70.600 mujeres) (9). En España se estima que hay 23.510 nuevos casos por año de cáncer de pulmón (20.350 hombres y 3.160 mujeres) con 20.590 muertes (17.840 hombres y 2.750 mujeres).

1.1. ESTADIFICACIÓN TNM

El CP se suele diferenciar según la clasificación histopatológica en cáncer de pulmón microcítico (Small Cell Lung Cancer, SCLC) y cáncer de pulmón no microcítico (Non-Small Cell Lung Cancer, NSCLC). El NSCLC supone el 85% aproximadamente de este tipo de tumor y el SCLC el 15% restante. Los subtipos más comunes de NSCLC son el carcinoma de células escamosas, carcinoma de células grandes, y adenocarcinoma, y en estos grupos histológicos pueden aparecer variantes de manera más infrecuente. Aunque el NSCLC está asociado con el humo del cigarro, algunos casos y en particular los adenocarcinomas pueden encontrarse en pacientes que nunca han fumado.

La actual clasificación TNM (la 8ª Edición) recientemente actualizada para el CP está reflejada en la Figura y Tabla 1. Resulta crucial una correcta clasificación de los pacientes ya que dependiendo de ella se adoptará la actitud terapéutica. Y del mismo modo aportará datos de supervivencia independientemente del tratamiento (Figura 2). En nuestro estudio, dado el periodo del reclutamiento, se empleó para la clasificación de los pacientes la edición 7ª.

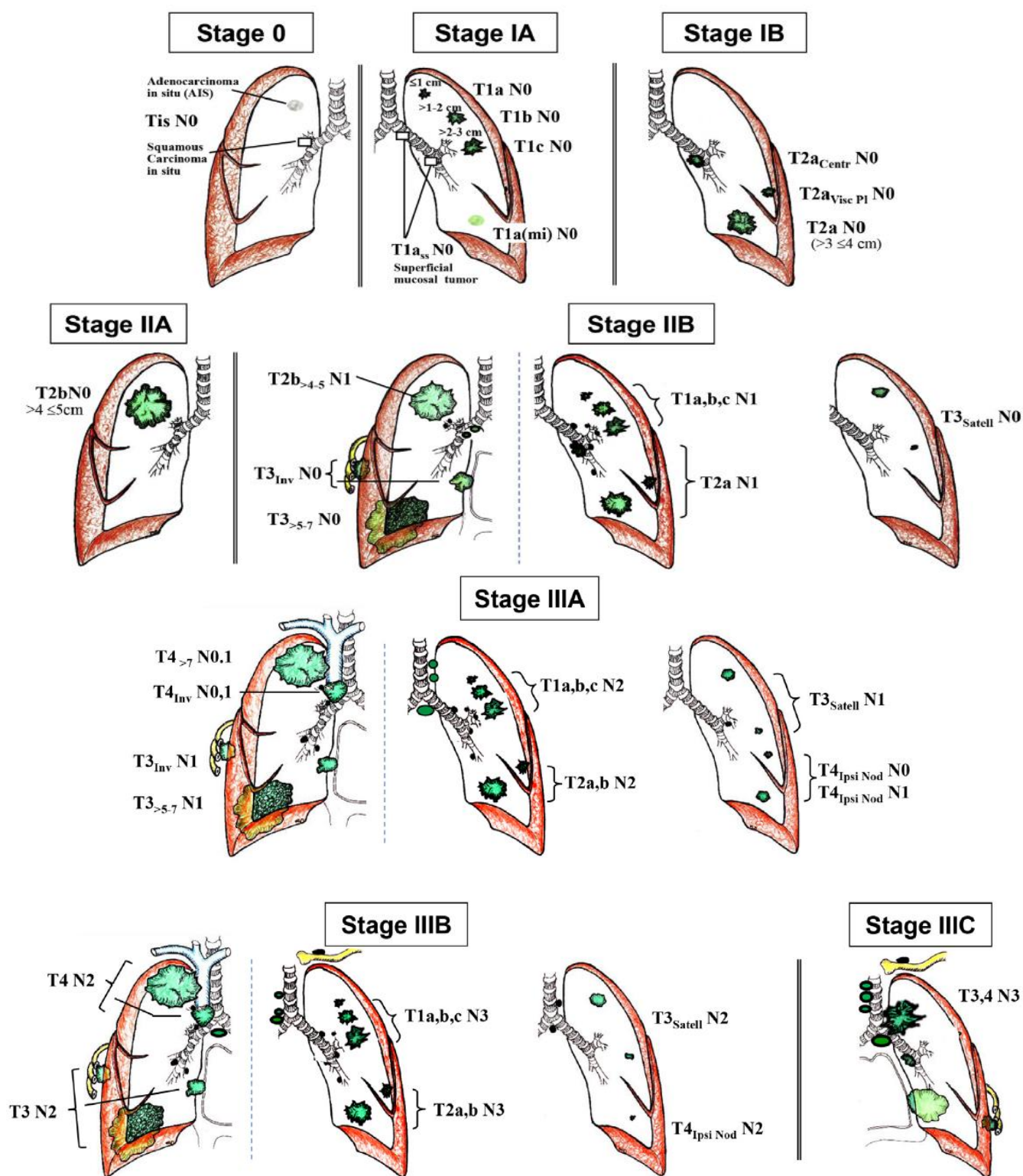


Figura 1. Clasificación gráfica TNM. Extraído de: The Eighth Edition Lung Cancer Stage Classification (10).

T	N				M	
	0	1	2	3	1a-1b	1c
1a	IA1	IIB	IIIA	IIIB	IVA	IVB
1b	IA2	IIB	IIIA	IIIB		
1c	IA3	IIB	IIIA	IIIB		
2a	IB	IIB	IIIA	IIIB		
2b	IIA	IIB	IIIA	IIIB		
3	IIB	IIIA	IIIB	IIIC		
4	IIIA	IIIA	IIIB	IIIC		

Tabla 1. Estadiaje del Cáncer de Pulmón según TNM. Adaptado de: AJCC Cancer Staging Manual. 8th Ed. New York, NY: Springer; 2017: 431-456.

A pesar de que la clasificación TNM se emplea para cualquier subtipo de CP, para el SCLC suele usarse la clasificación propuesta por el grupo **VALSG** (Veterans Administration Lung Study Group) (11), que los diferencia en dos subgrupos:

- **Enfermedad limitada al tórax:** pacientes que al diagnóstico presentan una enfermedad limitada a tórax englobable con un campo razonable de irradiación.

- **Enfermedad extendida:** enfermedad con metástasis a distancia o no abarcable dentro de un campo de irradiación.

La IASCLC (International Association for the Study of Lung Cancer) recomienda el empleo conjunto con la clasificación TNM para la correcta definición del estadiaje de todo paciente con SCLC por el valor pronóstico que ésta clasificación aporta a la descripción del tumor (12).

Los pacientes con SCLC y enfermedad limitada que no reciben tratamiento tienen una supervivencia de 3 meses aproximadamente desde el momento del diagnóstico. En el caso de los pacientes con SCLC y enfermedad extendida la supervivencia es de 2 meses (13). Sin embargo en los pacientes con tratamiento la mediana de supervivencia en pacientes con enfermedad limitada asciende a 16-20 meses con un porcentaje de pacientes vivos a los 5 años del 20-25%, mientras que en los pacientes con enfermedad extendida es de 7-9 meses, con menos del 5% de los pacientes vivos a los 5 años. Entre el 60% y el 70% de los pacientes con SCLC tienen enfermedad extendida en el momento del diagnóstico.

Los pacientes con enfermedad en estadios iniciales pueden curarse mediante cirugía o radioterapia estereotáctica ablativa (SABR). El control local se puede lograr con RT exclusiva en un gran número de pacientes con enfermedad no resecable o pacientes inoperables. Los pacientes con enfermedad no resecable localmente avanzado pueden lograr una supervivencia a largo plazo con la radioterapia combinada con quimioterapia. Los pacientes con enfermedad

metastásica avanzada pueden lograr mejor supervivencia y paliación de los síntomas con quimioterapia, terapias con agentes dirigidos, y otras medidas de soporte.

Los pacientes con NSCLC tras cirugía poseen una supervivencia a los 5 años para el estadio I de 55-65%, para el estadio II de 40-50% y para el estadio IIIA de 20-25%. La supervivencia global a los 5 años añadiendo quimioterapia puede aumentar hasta el 69%. En el momento del diagnóstico solo el 20-30% de los pacientes con NSCLC poseen estadio localizado. Aproximadamente el 50% de los pacientes presentan estadio avanzado en el momento del diagnóstico (14-16).

En general, sin tener en cuenta los tratamientos previos, los pacientes en estadio I (IA1, IA2, IA3, IB) de NSCLC presentan una tasa de supervivencia a 5 años entorno al 92%, 83%, 77%, 68%, respectivamente. Los que presentan un estadio IIA y IIB esta supervivencia a 5 años es del 60% y 53%, respectivamente. Para los estadio III: IIIA 36%, IIIB 26% y IIIC 13%. Sin embargo, en pacientes diseminados la tasa de supervivencia a 5 años disminuye hasta un 10% en estadio IVA y es menor al 1% en pacientes en estadio IVB (Figura 2).

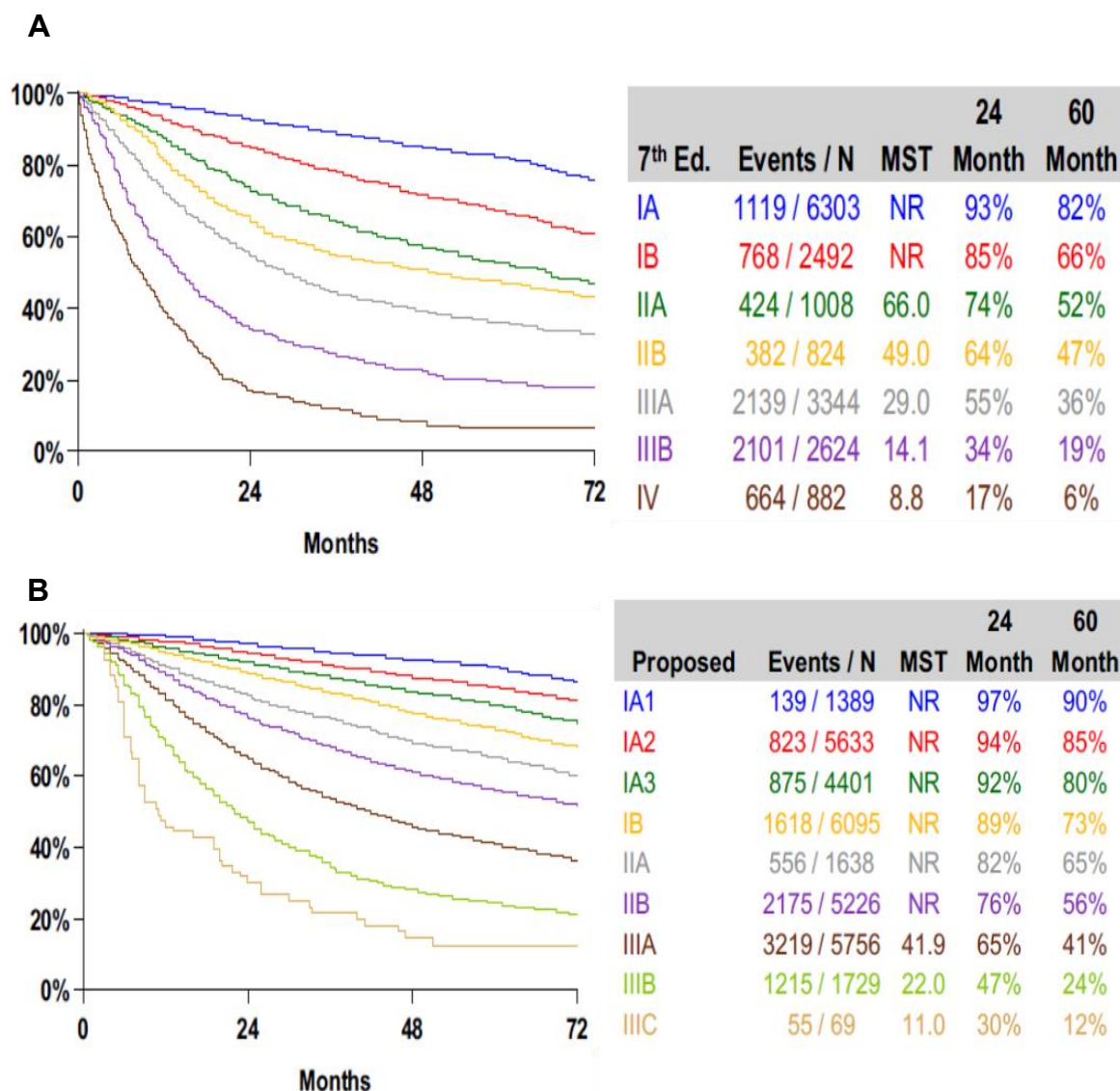


Figura 2. Supervivencia global por Estadio patológico de acuerdo con la séptima edición (A) y la esperada según la octava edición (B) agrupaciones que utilizan toda la base de datos disponible para la octava edición. MST, tiempo medio de supervivencia. Extraído de The IASLC Lung Cancer Staging Project: Proposals for Revision of the TNM Stage Groupings in the Forthcoming (Eighth) Edition of the TNM Classification for Lung Cancer (17)

1.2. ETIOLOGÍA DEL CÁNCER DE PULMÓN

Haiman et al. publicaron en 2006 un estudio que mostró que existen diferencias étnicas y raciales en el riesgo relativo de cáncer de pulmón para todos los tipos histológicos (18). El último informe GLOBOCAN de 2012 refleja que aproximadamente el 58% de todos los CP ocurrieron en países menos desarrolladas (1). El factor de riesgo más importante para el desarrollo del CP es el tabaquismo. Otros factores atribuibles incluyen la exposición ambiental a diferentes agentes como el radón y el amianto; ciertos metales como cromo, cadmio y arsénico; algunos productos químicos orgánicos; la radiación; el humo del carbón; así como la emisión de combustible en interiores (19, 20). Dado que estos factores de riesgo son altamente prevenibles mediante estrategias poblacionales preventivas, como por ejemplo aquellas destinadas a dejar de fumar y la promoción de aire limpio en las ciudades, debería ser posible reducir su incidencia y la consecuente mortalidad (21).

Aproximadamente el 85% de todos los casos de cáncer de pulmón son causados por carcinógenos presentes en el humo del tabaco, mientras que entre el 15% y el 25% de los casos ocurren en no fumadores (22). Por ello es importante asociar la susceptibilidad genética al desarrollo del CP. Esta implicación genética no es sencilla de evaluar, ya que no se trata de una herencia ligada a unos pocos genes dominantes, sino que el riesgo viene definido por numerosos polimorfismos y cuando varios de ellos coinciden en un individuo concreto, definen un riesgo cuantitativo. Otra dificultad para la

investigación resulta del desconocimiento de los agrupamientos genéticos concretos que pueden definir el riesgo de cada tipo de CP (20). Se cree que la exposición al tabaco, radón o asbesto conlleva a alteraciones genéticas en el DNA de las células pulmonares. Se ha estimado que cuando el tumor se manifiesta en la clínica, ya se han acumulado unas 10-20 mutaciones genéticas.

Existen diferentes anomalías genéticas que se han asociado al CP (22). A saber, 1) Mutaciones de protooncogenes: genes en los que una mutación hace que se transformen en oncogenes. Los más conocidos son el ERBB-1 también llamado Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) y ERBB-2. Otros protooncogenes relacionados con el CP son los del grupo RAS, el más conocido es el K-RAS y los del gen MYC, cuyo miembro más conocido es C-MYC, más frecuentemente expresado en el SCLC. 2) Mutaciones de genes encargados de la reparación del DNA: genes que codifican proteínas encargadas de la regulación del ciclo celular, en la reparación de daños del DNA aberrante y frenar su replicación. Uno de ellos es el gen FHIT, cuyas mutaciones pueden estar presentes entorno al 80% de los SCLC y están asociadas fuertemente con el humo del tabaco. Y 3) Mutaciones en los genes supresores de tumores (GST): los GST son genes encargados de codificar proteínas implicadas en el control de la división del ciclo celular y la reparación del DNA aberrante. Los más investigados son el gen del retinoblastoma (RB) y el P53.

1.3. FACTORES MOLECULARES

En los últimos años han emergido varios biomarcadores como marcadores predictivos y pronósticos para el CP, fundamentalmente para el NSCLC. Un biomarcador predictivo es indicativo de la eficacia terapéutica, porque existe una interacción entre el biomarcador y el tratamiento en el resultado del paciente. Un biomarcador pronóstico es indicativo de la supervivencia del paciente independientemente del tratamiento recibido, porque el biomarcador es un indicador de la agresividad innata del tumor. Dada la prevalencia y supervivencia los estudios más actuales se han ido desarrollando en el estudio del NSCLC.

El CP y la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) suelen estar asociadas en fumadores, y se ha comprobado que la presencia de EPOC aumenta el riesgo de desarrollar CP. Paz ares et al. evaluaron distintos perfiles proteómicos objetivando las principales vías involucradas en el desarrollo tumoral estaban relacionadas con la señalización inflamatoria, la eliminación de radicales libres y la respuesta al estrés oxidativo. El potencial biomarcador más importante en la asociación de ambas entidades era la vía del factor nuclear NF- κ B (23).

Los biomarcadores predictivos incluyen:

- la fusión del oncogén ALK (fusión entre ALK y otros genes)
- reordenamientos del gen ROS1

- Mutaciones que sensibilizan al gen EGFR
- mutaciones puntuales BRAF V600E y ligando PD-1 (PD-L1)

Los biomarcadores emergentes incluyen:

- mutaciones HER2 (también conocido como ERBB2),
- reordenamientos del gen RET
- amplificaciones del gen MET
- mutaciones de omisión del exón 14 de MET (METex14)

La presencia de deleciones del exón 19 de EGFR o mutaciones del exón 21 L858R predicen el beneficio del tratamiento con el inhibidor de la tirosina quinasa de EGFR (EGFR TKI) (por ejemplo, Erlotinib); por lo tanto, estas mutaciones se conocen como mutaciones de EGFR sensibilizadoras (24, 25). La presencia de las deleciones del exón 19 de EGFR (LREA) o las mutaciones del exón 21 L858R no parecen ser un factor pronóstico de supervivencia para los pacientes con NSCLC, independientemente del tratamiento recibido (26).

Los oncogenes de fusión ALK (es decir, los reordenamientos del gen ALK) y los reordenamientos ROS1 son biomarcadores predictivos que se han identificado en un pequeño subconjunto de pacientes con NSCLC; ambos predicen el beneficio de la terapia dirigida, como Crizotinib o Ceritinib. Recientemente se han identificado otros reordenamientos de genes (fusión de distintos genes, como RET) que son susceptibles a terapias dirigidas con fármacos como Cabozantinib o Vandetanib (27-31).

Se recomienda realizar pruebas de reordenamientos del gen ALK y mutaciones del gen EGFR (ambos con una recomendación de categoría 1) en el algoritmo del diagnóstico del NSCLC (histología no escamosa) para que los pacientes con estas anomalías genéticas puedan recibir un tratamiento eficaz y dirigido con agentes específicos como el Alectinib o Erlotinib (32-36). Las pruebas para reordenamientos ROS1 y mutaciones BRAF también se recomiendan en los NSCLC no escamosos. Aunque es raro, los pacientes con reordenamientos de ALK o mutaciones de EGFR pueden tener una histología mixta de células escamosas (37, 38). Por lo tanto, las pruebas de reordenamientos de ALK y las mutaciones de EGFR pueden considerarse en pacientes seleccionados con histología de células escamosas sin antecedentes previos de hábito tabáquico, si se analizó una pequeña muestra de tejido pulmonar en la biopsia diagnóstica, o si el informe de anatomía patológica especifica histología mixta. Los datos sugieren que las mutaciones de EGFR pueden ocurrir en pacientes con carcinoma adenoescamoso, que es más difícil de diferenciar del carcinoma de células escamosas en muestras pequeñas (37). Por lo tanto, se recomiendan pruebas de mutaciones de EGFR y reordenamientos de ALK en muestras con componente mixto de células escamosas que contienen un componente de adenocarcinoma como el NSCLC adenoescamoso (36). La incidencia de mutaciones de EGFR es muy baja en pacientes con histología de células escamosas puras (<4%) (39).

Las alteraciones genéticas de EGFR, KRAS, ROS1 y ALK generalmente no se superponen; por lo tanto, las mutaciones KRAS pueden identificar a los pacientes que no se beneficiarán de las pruebas moleculares (27, 40, 41). Las

mutaciones BRAF generalmente no se superponen con las mutaciones EGFR o los reordenamientos ALK (42, 43).

Se están identificando otras mutaciones y reordenamientos genéticos, como los reordenamientos del gen RET, la amplificación de MET o las mutaciones de METex14, y las mutaciones de HER2 (31, 44-46).

Se recomienda un estudio completo del perfil molecular más amplio para identificar mutaciones raras y así poder asegurar que los pacientes reciban el tratamiento personalizado más apropiado.

El oncogén KRAS es un biomarcador pronóstico. La presencia de mutaciones KRAS es un pronóstico de escasa supervivencia para los pacientes con NSCLC en comparación con la ausencia de mutaciones en KRAS, independientemente del tratamiento (47). Las mutaciones de KRAS también predicen la falta de beneficio de la terapia con EGFR TKI (48, 49). Las alteraciones genéticas de EGFR, KRAS, ROS1 y ALK no suelen superponerse (40, 41, 50). Por ello, el tratamiento con inhibidores de la enzima tirosina quinasa (TKI) de EGFR (EGFR TKI, Erlotinib) no es efectivo en pacientes con mutaciones KRAS, mutaciones BRAF V600E, reordenamientos del gen ALK o reordenamientos ROS1. En general, las mutaciones/alteraciones se observan de manera no superpuesta, aunque entre el 1% y el 3% de NSCLC puede albergar alteraciones concurrentes.

En la tabla 2 se reflejan las principales terapias dirigidas para pacientes con alteraciones genéticas en Cáncer de Pulmón.

ALTERACIÓN GENÉTICA	AGENTES ESPECÍFICOS DISPONIBLES CON ACTIVIDAD EN CP
Amplificación MET o mutación exón 14 MET	Crizotinib
Reordenamientos de RET	Cabozantinib, Vandetanib
Mutaciones HER2	Ado-Trastuzumab Emtansine
Mutaciones EGFR	Afatinib, Erlotinib, Gefitinib, Osimertinib
Reordenamientos ALK	Alectinib, Ceritinib, Crizotinib
Reordenamientos ROS1	Ceritinib, Crizotinib
Mutación BRAF V600E	Dabrafenib, Trametinib
Expresión PD-L1	Pembrolizumab, Atezolizumab, Nivolumab

Tabla 2. Agentes emergentes dirigidos para pacientes con alteraciones genéticas en Cáncer de Pulmón.

1.4. TRATAMIENTO DE RADIOTERAPIA

La Oncología Radioterapia (RT) es una especialidad médica , fundamentada en el uso terapéutico de las radiaciones ionizantes especialmente en pacientes con neoplasias malignas y enfermedades benignas, sola o en combinación con otras modalidades de tratamiento como la cirugía, terapias antitumorales (quimioterapia, terapias biológicas, hormonoterapia...), oxígeno e hipertermia según se refleja en la Orden SCO/3142/2006, de 20 de septiembre, por la que se aprueba y publica el programa formativo de la Especialidad de Oncología Radioterápica (BOE, nº 245, de 13 de octubre de 2006).

El objetivo del tratamiento con radiaciones es administrar una dosis en el volumen de interés, que produce un daño mediante una serie de interacciones y depósito de energía, capaz de erradicar el tumor, limitando dicho efecto sobre los tejidos sanos, para conseguir el control tumoral, los menores efectos secundarios, y proporcionar un aumento de supervivencia con la mayor calidad de vida.

Además de la intención radical de los tratamientos, la RT juega un papel muy importante en el manejo de la paliación en pacientes en situación terminal, proporcionando un buen tratamiento de soporte (analgésico, hemostático, descompresivo...), así como en la prevención de los síntomas de la enfermedad de una manera eficaz y poco cruenta.

Históricamente, se definían empíricamente los tamaños de los campos y las dosis de tratamiento en radioterapia, la llamada Radioterapia en 2 Dimensiones (RT2D). Estos tratamientos eran algo imprecisos y no precisaban completamente la anatomía, fisiología y dosimetría subyacentes. La primera gran revolución fue la implementación de la planificación tridimensional (3D) que aportaba ya una importante correlación cuantitativa entre las dosis prescritas y los volúmenes delimitados con los resultados clínicos. Cuando la información dosimétrica de las planificaciones en 3D se hizo extensamente disponible, se desarrollaron protocolos dentro de las guías clínicas para ayudar a los médicos a poder predecir una relativa seguridad en los planes de tratamiento propuestos. En 1991, un grupo de investigadores aunaron su experiencia clínica con respecto a las dosis de tolerancia a los órganos sanos, y se plasmó con la publicación del estudio de Emami et al (51). La importancia de este informe es que atendía a una necesidad clínica ya que hasta entonces no existía consenso alguno, además el propio informe expone claramente las incertidumbres y limitaciones de sus recomendaciones en aquel momento.

Tras su publicación numerosos estudios fueron mostrando diferentes asociaciones entre los valores dosimétricos y los resultados observados en los tejidos sanos. La publicación definitiva de QUANTEC (QUAntitative Analysis of Normal Tissue Effects in the Clinic) (52) resume los datos disponibles hasta su fecha para redefinir, actualizar y refinar las estimaciones publicadas por Emami et al. La publicación de toda esta información se esperaba que mejorara la atención al paciente al proporcionar a los médicos unas herramientas para

estimar distribuciones de dosis en 3D clínicamente óptimas (dosis tumoricidas) y aceptables (teniendo en cuenta la tolerancia de los tejidos sanos).

En la actualidad con los avances tecnológicos se desarrollan técnicas de irradiación de alta conformación y distribución de dosis con diferentes niveles ajustados a la carga tumoral en cada zona del tejido, lo que conocemos con IMRT y RT guiada por imagen (IGRT), para garantizar el depósito de la dosis con alta precisión salvaguardando los tejidos sanos.

Las nuevas técnicas de imagen como la tomografía por emisión de positrones (PET) se han incorporado en la planificación del tratamiento de RT para una mejor delimitación del volumen blanco (53-55).

1.5. TOXICIDADES DE ÓRGANOS SANOS

Los efectos tóxicos inducidos por la radiación en el tejido normal se relacionan con la dosis, el volumen y el tiempo total de tratamiento. En el caso de tejido en el que las subunidades funcionales están dispuestas en serie, como la médula espinal, el esófago, la tráquea, los bronquios, los vasos y los nervios, la integridad de cada unidad es importante para la función del órgano, y la eliminación de cualquier unidad puede resultar en una toxicidad significativa. En este caso, debemos reducir al mínimo los puntos calientes, en particular una dosis muy alta, a estos órganos, incluso para un pequeño volumen. En contraste, en tejidos en los que las subunidades funcionales están dispuestas

en paralelo, tales como el pulmón o los riñones, la integridad de cada unidad es menos importante; en cambio, el volumen irradiado juega un papel importante en las complicaciones en estos tejidos. La toxicidad del tratamiento con radiaciones, unida a la que puede sobrevenir de la cirugía y de los tratamientos farmacológicos se mide mediante los Criterios Comunes de Toxicidad, estableciéndose una graduación para cada órgano y sistema, de manera objetiva, de tal modo que universalizan criterios que permiten una correcta comparación de resultados. En el caso de la irradiación torácica en las neoplasias pulmonares las toxicidades más frecuentes son neumonitis y esofagitis, siendo las que condicionan y limitan las dosis tumoricidas que se pueden administrar (56-58). A continuación nos centraremos en la esofagitis.

1.6. ESOFAGITIS RÁDICA

La esofagitis es uno de los efectos secundarios más frecuentes del tratamiento con radioterapia en tumores torácicos siendo, además, un factor limitante de la dosis total que podemos administrar (59, 60). El empleo de tratamientos combinados de radioterapia y quimioterapia de manera concomitante incrementan la incidencia, así como el grado de severidad de dicha toxicidad. La evolución de la tecnología en radioterapia está permitiendo minimizar la dosis administrada en los órganos sanos, disminuyendo así los efectos secundarios sobre ellos. A pesar de esto, la proximidad del esófago a los

volúmenes de tratamiento en el CP hace que éste sea expuesto, inevitablemente, a dosis altas de irradiación (61).

1.6.1. Fisiopatología

La radiación ionizante provoca una alteración en el DNA que condiciona la activación de señales proinflamatorias mediadas por una serie de citoquinas específicas, que ocasionan la muerte celular (62). El tracto gastrointestinal presenta un continuo recambio en las células de su mucosa, lo que le hace tremendamente vulnerable a la radioterapia, en especial el esófago. La inflamación mucosa y disminución de su epitelio basal puede evolucionar hasta lesiones severas como la ulceración o la desaparición total del epitelio.

1.6.2. Síntomas

La clínica de esofagitis aguda (la que se produce desde el inicio del tratamiento con RT hasta los primeros 6 meses) se manifiesta en forma de anorexia, disfagia, odinofagia, náuseas, y/o dolor retroesternal (63). En casos más graves puede conllevar a la desnutrición, deshidratación, pérdida de peso y broncoaspiración (59, 63-68). Una de las clasificaciones más frecuentemente utilizadas para la evaluación de la toxicidad es la “Common Terminology Criteria for Adverse Events” (CTCAE) (Tabla 7). Varios autores han demostrado la correlación entre los síntomas y el grado de la lesión de la mucosa esofágica

aguda, tras RT exclusiva o con radioquimioterapia concurrente (CRT), siendo más frecuentes y graves en ésta última secuencia de tratamientos (69).

En cuanto a la esofagitis tardía (la que puede ocurrir pasados los 6 meses del inicio de la radioterapia) puede presentarse con síntomas de estenosis esofágica tardía incluyendo disfagia mecánica por estenosis o alteración de la motilidad secundaria al daño neuronal (63, 70) y odinofagia. También puede manifestarse en formas más graves como perforación, fibrosis de la submucosa, atrofia de la mucosa o ulceración (66, 71). La presencia de complicaciones tardías como aspiración crónica o fístula broncoesofágica pueden manifestarse como infecciones pulmonares recurrentes (72).

No hay evidencia clínica de que la incidencia o severidad se correlacione con la respuesta tumoral a los tratamientos recibidos.

No existen criterios específicos que puedan distinguir de forma fiable entre los síntomas post-RT causados por la progresión tumoral frente aquellos que son debidos a los tratamientos (65, 66). Esta incertidumbre en la causalidad puede dar como resultado una infra o sobre-estimación de toxicidad en la interpretación de los datos clínicos individuales (73). Algunos autores atribuyen complicaciones al tumor si está presente (enfermedad persistente o recurrente) mientras que otros refieren todos los eventos adversos después de RT como inducidos por el tratamiento, independientemente de que el tumor esté realmente controlado, atribuyendo síntomas que empeoran mucho después del tratamiento, a la toxicidad por RT.

1.6.3. Factores de riesgo

- Factores dependientes del paciente y de la enfermedad

Muchos han sido los factores de riesgo asociados al aumento en la incidencia de esofagitis aguda, entre ellos destacan: raza caucásica (63), sexo femenino (74), edad ≥ 70 años (75), mala situación basal al inicio de los tratamiento (performance status) (74), baja masa corporal (76), enfermedad por reflujo gastroesofágico (77) y disfagia previa (74). Otros autores han descrito otros factores como predisponentes, a saber: la neutropenia durante la CRT se correlaciona con una mayor disfagia (78), la localización del tumor primario en los lóbulos superiores y la afectación de estaciones ganglionares superiores (74), así como la presencia de metástasis en los ganglios mediastínicos ipsilaterales y/o en los ganglios subcarinales (N2). Todo ello justificado, probablemente, al volumen de esófago irradiado.

Los tumores con infiltración del esófago o el árbol bronquial proximal aumentan el riesgo de fístula o perforación como manifestación de toxicidad tardía. Los polimorfismos de la línea germinal pueden hacer que algunos pacientes sean más susceptibles a las lesiones que otros (62).

- Factores dependientes del tratamiento

Los aspectos de la RT que actúan como factor de riesgo para el desarrollo de la esofagitis rádica incluyen: el volumen de tejido irradiado, la dosis total, la dosis administrada por día (fraccionamiento), la técnica de RT y el tratamiento sistémico concurrente (66, 79) (Tabla 3).

TRATAMIENTO	RÉGIMEN ^a	TÉCNICA/ N	ESOFAGITIS AGUDA
Intención curativa RT con QT concurrente	<ul style="list-style-type: none"> • 60 Gy o 74 Gy • Carboplatino y paclitaxel 	IMRT o RTC3D N = 544	<ul style="list-style-type: none"> • ≥ Grado 3^d: 21% vs 7% • ≥ Grado 4: 0
	<ul style="list-style-type: none"> • Dosis mediana 65 Gy • Quimioterapia basada en platinos 	IMRT o RTC3D N = 1082 ^b	<ul style="list-style-type: none"> • Grado 2: 32.2% • Grado 3: 17.1% • Grado 4: 0.9% • Grado 5: 0
	<ul style="list-style-type: none"> • 69.6 Gy / 58 a 1.2 Gy BID • Cisplatino y etop�sido 	2D N = 528 ^b	<ul style="list-style-type: none"> • ≥ Grado 2: 75% (sin diferencia entre brazos). • ≥ Grado 3: 70% en el brazo hiperfraccionado vs 22% en brazo RT estándar (p <0,0001). • ≥ Grado 4: 2%
	<ul style="list-style-type: none"> • 63 Gy • Cisplatino y vinblastina 		
	<ul style="list-style-type: none"> • 69.6 Gy • Cisplatino y vinblastina 		
	<ul style="list-style-type: none"> • 60 Gy • cisplatino secuencial y vinblastina o etop�sido 	2D N = 461 ^b	<ul style="list-style-type: none"> • Grado ≥3: 1.3%
	<ul style="list-style-type: none"> • 60 Gy • cisplatino secuencial y concurrente y vinblastina o etop�sido 		<ul style="list-style-type: none"> • Grado ≥3: 6%
	<ul style="list-style-type: none"> • 69.6 Gy / 58 como 1.2 Gy BID • cisplatino concurrente y vinblastina o etop�sido 		<ul style="list-style-type: none"> • Grado ≥3^d: 34%

	<ul style="list-style-type: none"> • CRT concomitante • CRT secuencial 	RTC2D en 5 ensayos RTC3D en 1 ensayo N = 1,205 ^b	<ul style="list-style-type: none"> • Grados 3-4: 4% en secuencial y 18% con CRT concurrente (RR 4,9; CI 95% 3.1-7.8, p<0.01).
CHART versus RT convencional	<ul style="list-style-type: none"> • 54 Gy / 36 a 1.5 Gy TID durante 12 días (CHART) • 60 Gy (convencional) 	2D N = 563	<ul style="list-style-type: none"> • Disfagia severa aguda: 19% (CHART) vs 3%.
SBRT	• 45 Gy / 5 Fx	SBRT N = 108	<ul style="list-style-type: none"> • Con dosis mediana en esófago > 30 Gy, esofagitis grado >2 en 50% (si el volumen tratamiento se superpuso al esófago).
	• 54 Gy / 3 Fx ^c	SBRT N = 44	Eventos adversos GI: <ul style="list-style-type: none"> • Grado 1: 7.3% • Grado 2: 1.8% • Grado 3: 1.8% • Grado 4-5: 0%
RT convencional Paliativa	• 25 Gy / 10 Fx seguido de un descanso de 2 semanas, seguido por 25-32.5 Gy / 10-13 Fx ("Split-course")	2D o RTC3D N = 140	Esofagitis aguda: <ul style="list-style-type: none"> • Leve 34% • Moderado a severo 10%
	• Varios regímenes ^e	2D o RTC3D N = 3473 ^b	<ul style="list-style-type: none"> • Regímenes de baja dosis: 15% • Regímenes de alta dosis: 21%

Tabla 3. Tasas de incidencia de esofagitis aguda con diferentes técnicas de RT de tratamiento para cáncer de pulmón no microcítico. Adaptada de Radiation-induced esophagitis in lung cancer de Sarah Baker publicado en Lung Cancer (80). Abreviaturas: 2D, bidimensional; RTC3D, radioterapia conformada tridimensional; BID, dos veces por día; CHART, radioterapia acelerada hiperfraccionada continua; Fx, fracciones; IMRT, radioterapia de intensidad modulada; N, número de pacientes; RT, radioterapia; SBRT, radioterapia corporal estereotáctica; TID, tres veces por día.

^aFracción estándar de 1.8 a 2 Gy por día a menos que se especifique lo contrario. ^bMeta-análisis. ^cTumores T1 o T2 > 2 cm del árbol bronquial proximal. ^dSignificativamente mayor en un brazo con dosis RT más altas. ^eRegímenes de dosis bajas administradas <35 Gy / 10 sesiones y regímenes de dosis altas administradas >35 Gy / 10 sesiones.

Un meta-análisis publicado en 2010 comparó 19 ensayos aleatorios de CRT radical frente a la RT exclusiva, incluyendo la administración sistémica concurrente y/o secuencial de quimioterapia, afirmando que la combinación de quimioterapia a la RT aumenta el riesgo de esofagitis aguda aproximadamente cinco veces (81). Los estudios que han ido estableciendo las dosis limitantes de RT en el tratamiento del CP para el riesgo de desarrollar esofagitis rádica están recogidos en la tabla 4.

RELACIÓN ENTRE FACTORES DOSIMÉTRICOS Y RIESGO DE ESOFAGITIS		
Autor	Escala CTCAE/RTOG	Parámetro Dosimétrico
Singh 2003	≥ Grado 3	Dmax < 58% RE 0% MED > 34 Gy RE 100%
Ahn 2005 (64)	≥ Grado 3	Dmax < 40 Gy RE 0% Dmax < 40-50 Gy RE 15% Dmax 50-70 Gy RE 17-28%

Kim 2005 (82)	\geq Grado 2	V60 \leq 30% sin CRTC RE 0% V60 > 30% sin CRTC RE 14% V60 \leq 30% con CRTC RE 11% V60 > 30% con CRTC RE 33%
Wei 2006 (83)	\geq Grado 3	V20 < 45% con MED < 28 Gy RE >15%
Takeda 2006 (84)	\geq Grado 1	V35 \leq 15% RE 42,9% V35 entre 15-30% RE 66,6% V35 > 30% RE 86,2%
Rodríguez 2009 (85)	\geq Grado 1	V50 < 30% RE 47,3% V50 \geq 30% RE 73,3%
Watkins 2009 (86)	\geq Grado 3	V15 < 60% RE 15% V15 \geq 60% RE 64%
Topkan 2009 (87)	\geq Grado 2	V55 < 35% RE 31% V55 \geq 35% RE 76%
Ozgen 2012 (88)	\geq Grado 2	MED < 28 Gy RE 0% MED \geq 28 Gy RE 60,7%
Kuroda 2013 (89)	\geq Grado 2	V35 < 20% RE 35,7% V35 \geq 20% RE 88,9%
Zhang 2014 (90)	\geq Grado 2 \geq Grado 3	V40 < 23% con CRTC RE 33% V40 \geq 23% con CRTC RE 89,1% V50 < 26,5% con CRTC RE 6,7%

		V50 \geq 26,5% con CRTC RE 38,7%
Grant 2015 (91)	\geq Grado 3	V5 > 74% RE 12,6% V5 \geq 74% RE 44,4%

Tabla 4. Relación entre factores dosimétricos y riesgo de esofagitis según diferentes publicaciones. Abreviaturas: Dmax, dosis máxima; MED, dosis media; RE, Riesgo de Esofagitis Rádica; Vx, volumen de esófago normal que recibe X Gy o más; CRTC, radioquimioterapia concomitantes.

- Nuevas Tecnologías en Oncología Radioterápica.

El importante desarrollo tecnológico que se ha producido en la última década en RT (IMRT, VMAT, Tomoterapia, SABR...) nos permite en la actualidad realizar tratamientos complejos altamente conformados que nos permiten administrar dosis altas al volumen tumoral, protegiendo a los tejidos sanos de las dosis más altas. Pacientes tratados con CRT mediante técnicas 2D de RT presentaban una incidencia de esofagitis grado 2 en un 75%, grado 3 en el 22% y grado 4 en el 2% de los casos (63). Mientras que con IMRT y una misma secuencia concomitante de CRT pueden disminuir la incidencia de esofagitis grado 2 a un 32%, grado 3 a un 17% y grado 4 a un 0,9% (92).

1.6.4. Prevención:

- Limitaciones de dosis para esofagitis aguda post-radioterapia

Para la valoración de los tratamientos en RT nos fijamos en unos valores de referencia basados en “Quantitative Analyses of Normal Tissue Effects in the Clinic” (QUANTEC) (Tabla 5). Dichos parámetros ofrecen estimaciones del riesgo de toxicidad secundaria a RT en relación con la dosis media de tejido sano irradiado. Así por ejemplo, la dosis media a todo el esófago <34 Gy podría tener en una incidencia de esofagitis aguda grado >3 entre el 5% y el 20% (93). Otros valores de referencia predictivos de toxicidad incluyen: la dosis máxima en un punto del esófago (69 Gy para RT exclusiva y 58 Gy con QT concurrente), y el porcentaje de volumen de esófago que recibe >50 Gy (77, 94).

ESTRUCTURA	VOLUMEN	DOSIS/VOLUMEN	% DE TOXICIDAD	TOXICIDAD AGUDA
Esófago	Media	<34 Gy	5-20%	Esofagitis Grado ≥3
Esófago	V35	<50%	<30%	Esofagitis Grado ≥2
Esófago	V50	<40%	<30%	Esofagitis Grado ≥2
Esófago	V70	<20%	<30%	Esofagitis Grado ≥2

Tabla 5. Limitaciones de dosis para esofagitis aguda post-radioterapia.

Adaptado de: Use of normal tissue complication probability models in the clinic (QUANTEC) (95).

Un metanálisis de 2013 que incluía 1.082 pacientes diagnosticados de NSCLC sometidos a CRT radical encontró que el parámetro dosimétrico que mejor predeciría el riesgo de esofagitis fue el volumen de esófago que recibe ≥ 60 Gy (V60). Así, un V60 $< 0,07\%$ se asociaba con $< 5\%$ de riesgo de desarrollar esofagitis grado 3 o superior, pero V60 $\geq 17\%$ presentaría un riesgo del 59% de presentar esofagitis \geq grado 2 y un 22% de probabilidad de desarrollar una toxicidad esofágica aguda \geq grado 3 (92).

Wei et al analizaron 215 pacientes con NSCLC tratados con CRT secuencial y concluyeron como factores dosimétricos predictivos V20 $< 45\%$ y la dosis media en esófago < 28 Gy obteniendo un riesgo de esofagitis aguda grado ≥ 3 menor a un 15% (83).

- Restricciones de dosis para toxicidad esofágica tardía post-radioterapia

Emami et al publicaron en 1991 una estimación logarítmica de la dosis a la que el 5% de los pacientes desarrollan estenosis o perforación a los 5 años (TD 5/5) que sería de 60 Gy cuando se irradió un tercio de toda la longitud del esófago, de 58 Gy cuando dos tercios de esófago fueron irradiados y de 55 Gy tras la irradiación del esófago completo (51). Con un tercio del esófago irradiado a 72 Gy, el 50% de los pacientes desarrollaron complicaciones a los 5

años (TD 50/5) (Tabla 6). Cabe destacar que estas estimaciones se deducen de tratamientos de RT que empleaban técnicas menos conformadas que en la actualidad.

	TD 5/5			TD 50/5		
% Órgano	3/3	2/3	1/3	3/3	2/3	1/3
Esófago (estenosis, perforación)	5500	5800	6000	6800	7000	7200

Tabla 6. Restricciones de dosis para toxicidad esofágica tardía post-radioterapia. Adaptado de Emami (51).

- Fármacoprevención.

En la actualidad se emplean aminoácidos como la Glutamina para la prevención de la mucositis secundaria a tratamientos oncológicos. En 2016 se ha publicado una revisión sistemática sobre esta misma indicación de la glutamina. 11 de los 15 ensayos clínicos analizados han demostrado que la glutamina se establece como una sustancia efectiva en la reducción del desarrollo de mucositis (esofagitis e incluso estomatitis).

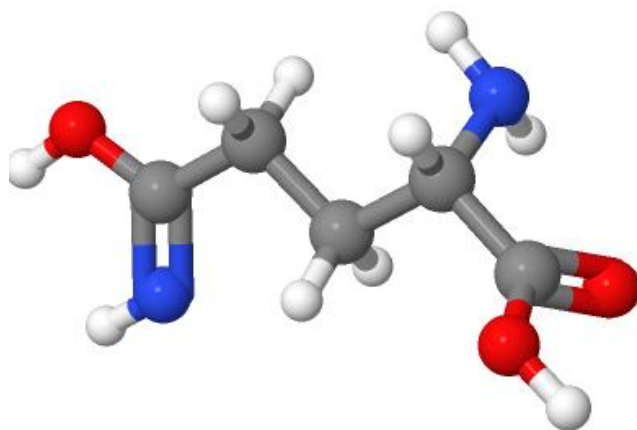


Figura 3. Estructura tridimensional del aminoácido Glutamina. Modificado de la web de acceso libre: [https://chemapps.stolaf.edu/jmol/jmol.php?&model=InChI=1S/C5H10N2O3/c6-3\(5\(9\)10\)1-2-4\(7\)8/h3H,12,6H2,\(H2,7,8\)\(H,9,10\)/t3-/m0/s1](https://chemapps.stolaf.edu/jmol/jmol.php?&model=InChI=1S/C5H10N2O3/c6-3(5(9)10)1-2-4(7)8/h3H,12,6H2,(H2,7,8)(H,9,10)/t3-/m0/s1).

La glutamina redujo significativamente la incidencia de mucositis sintomática (grados 2-4), así como para otras variables como fueron la pérdida de peso, la duración y el retraso del comienzo de la mucositis. La dosis recomendada es de 30 gramos al día (dosificada en 10 gramos cada 8 horas). Otras variables como la presencia de náuseas, vómitos, xerostomía o anorexia presentaron similar incidencia en el grupo con glutamina que en el grupo sin glutamina (96). Otros fármacos como la amifostina se han empleado para la prevención de la aparición de toxicidad pulmonar y esofágica en tratamientos con CRT. Sin embargo sigue presentando dudas sobre su eficacia, aunque podría reducir la toxicidad aguda en este contexto, la heterogeneidad en los datos publicados, hace más que cuestionable su efecto preventivo, de hecho en el momento

actual, no está recomendado su empleo de manera protocolizada en las guías de práctica clínica (97).

1.6.5. Diagnóstico

El diagnóstico de la esofagitis aguda por radioterapia es básicamente clínico y en muy pocas ocasiones se necesitan pruebas complementarias. La endoscopia oral es útil en el diagnóstico y tratamiento de la enfermedad esofágica, fundamentalmente tardía (98). Los hallazgos histológicos típicos de la esofagitis crónica por RT son: la inflamación de aparición tardía, la fibrosis y la atipia.

1.6.6. Manejo

Se recomienda la valoración por un nutricionista de inicio ya que puede realizar una valoración del riesgo de desnutrición mediante escalas validadas y establecer en función del resultado un seguimiento o una actuación concreta (suplementos, gastrostomía, sondaje, etc.). La odinofagia leve a moderada responde a los analgésicos tópicos como la lidocaína oral viscosa (99) y el tratamiento con antiinflamatorios no esteroideos. Los pacientes con disfagia para líquidos pueden llegar a requerir reposición intravenosa de líquido. La sonda nasogástrica controla la pérdida de peso, siendo ésta preferible a la nutrición parenteral por presentar menor riesgo de infección y una vuelta más rápida a la ingesta normal (100). En casos más graves de esofagitis se puede llegar a requerir la colocación de sonda de gastrostomía.

Los pacientes con esofagitis son más propensos a presentar reflujo esofágico, por lo que se deben prescribir inhibidores de la bomba de protones (IBP) o un inhibidor del receptor H2. Además, se recomienda administrar antifúngicos profilácticos debido a la alta incidencia de esofagitis candidiásica, especialmente en pacientes que reciben QT o terapia corticoidea (80).

La disfagia tardía que se manifiesta con pérdida de peso, es indicación de endoscopia digestiva alta para el diagnóstico de una probable estenosis esofágica tardía y su posible tratamiento mediante una dilatación endoscópica (62). La alimentación a través de la sonda de gastrostomía está recomendada en el contexto de estenosis resistentes a dilataciones endoscópicas para mantener un estado nutricional adecuado.

1.7. POLIMORFISMOS DE NUCLEÓTIDO SIMPLE (SNP)

Los polimorfismos de un solo nucleótido o SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) son una modificación de la secuencia de DNA que implica a una única base nitrogenada (adenina (A), timina (T), citosina (C) o guanina (G)) de la secuencia del genoma. Algunos autores, por el contrario, piensan que los cambios en diferentes nucleótidos pueden ser definidos también como SNPs, aunque el término más apropiado para ello sería Polimorfismo de Nucleótido Simple (101). Estos cambios de bases tiene que objetivarse en al menos un 1%

de la población para que se pueda definir como un SNP. Si no se alcanza ese 1% no sería considerado como un SNP sino como una mutación puntual.

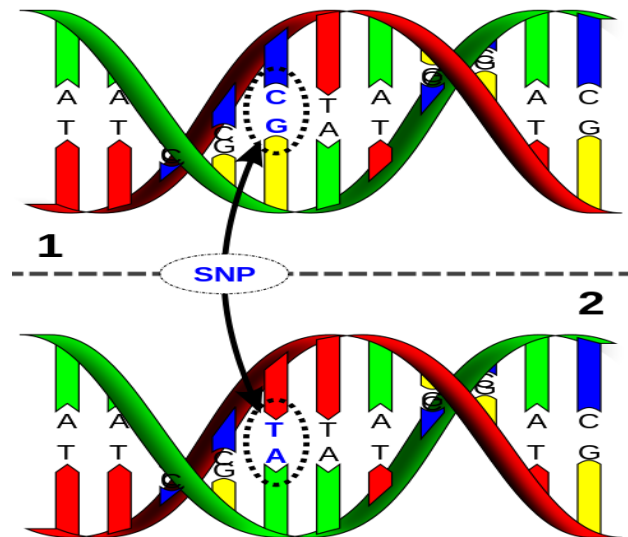


Figura 4. Representación de un SNP. Variación en un único par de bases del DNA. SNP model by David Eccles (gringer) [CC BY 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0>)].

Los SNPs sólo definen un emplazamiento cromosómico que posiblemente está asociado a un determinado fenotipo (102). Estas modificaciones en las secuencias del DNA pueden ver afectada la respuesta de los individuos a distintas enfermedades, la respuesta inmune del organismo ante bacterias o virus, las vías de degradación de productos químicos, la acción a distintos fármacos, etc.

Los SNPs, debido a su gran estabilidad, no tienen una gran variabilidad intergeneracional, por lo que es relativamente sencillo describir su genealogía

en estudios poblacionales. Actualmente se están desarrollando una gran variedad de estudios en este sentido, todos ellos enfocados en el progreso científico de los tratamientos personalizados.

1.7.1. FACTOR DE CRECIMIENTO TRANSFORMANTE BETA 1 (TGF- β 1)

El Factor de Crecimiento Transformante beta 1 (TGF- β 1, TGFB1) es una proteína perteneciente a la familia de los factores de crecimiento transformante beta de las citoquinas. Es una proteína con multitud de funciones en la célula, como por ejemplo el control de la proliferación y el crecimiento celular, y de los procesos de muerte celular programada y la diferenciación celular. En el ser humano, el TGF- β 1 está codificado por el gen *tgfb1* (103, 104).

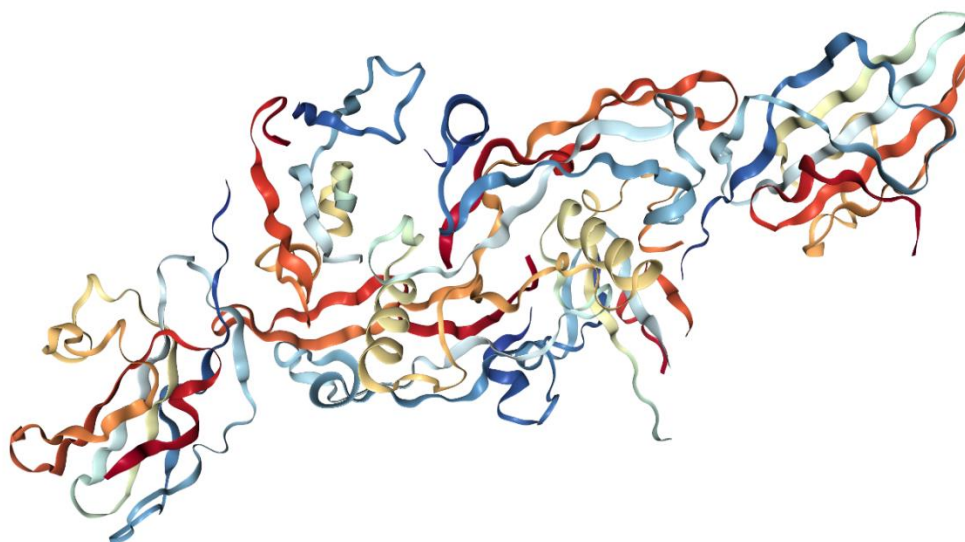


Figura 5. Estructura terciaria del TGF- β 1. (105)

Esta proteína interviene de manera sinérgica con el TGF-alfa en la inducción de la tumorigénesis (106, 107).

TGF- β 1 desempeña un papel importante en la regulación del sistema inmune, actuando sobre diferentes células inmunitarias y muchas de ellas secretan TGF- β 1 (108).

Asimismo esta proteína regula, entre otras funciones, la diferenciación y proliferación de otros tipos celulares. Por ejemplo, en la remodelación ósea juega un papel crucial ya que es un importante potenciador de la actividad osteoblástica, a través de su acción quimiotáctica, favorece la diferenciación y proliferación de los osteoblastos.

1.7.2. PROTEÍNAS DE CHOQUE TÉRMICO (HSP)

Las proteínas de choque térmico (HSP, Heat Shock Proteins), son un conjunto de proteínas sintetizadas por las células ante cualquier situación de estrés celular (factores físicos como la exposición al calor o al frío (109), así como a la luz ultravioleta (110), la resolución de las heridas (111) (condicionando la remodelación tisular), la presencia de sustancias tóxicas, como toxinas, quimioterapia, alcohol, microambiente con pH extremos, presencia de traumatismos, isquemia, radiaciones ionizantes, etc.) (112, 113). Muchas de estas proteínas tienen una actividad chaperona que condiciona la estabilización

de las proteínas dañadas por estrés celular asegurando su adecuado plegamiento (114-116).

Las HSP se unen a las proteínas desnaturalizadas para que, cuando ceda el estrés celular, puedan volver a su estructura tridimensional terciaria original, recuperando así su función.

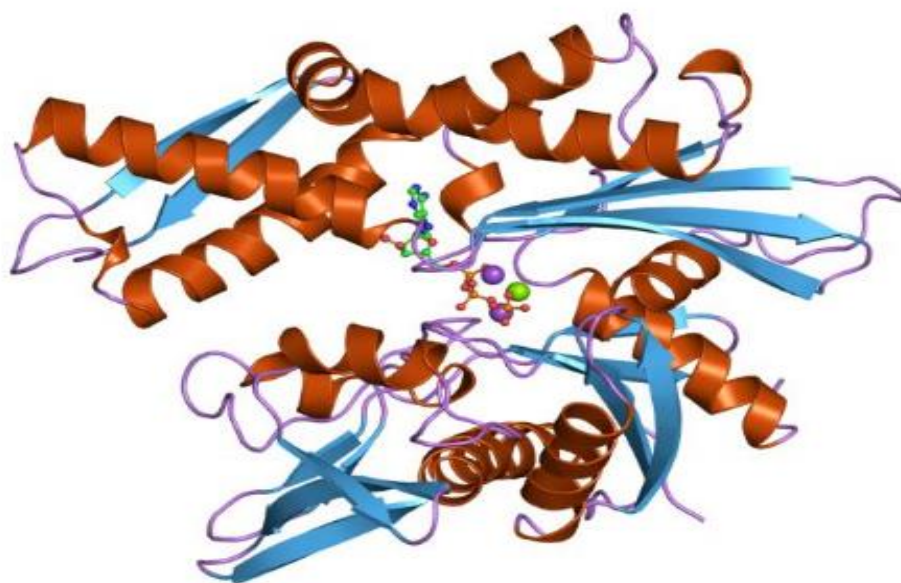


Figura 6. Estructura tridimensional de HSP 70KDa.(117)

Están siendo ampliamente estudiadas por desempeñar multitud de funciones:

- Hsp90, Hsp84, Hsp70, Hsp27, Hsp20 están asociadas en la vascularización cardíaca (118). HSP20 se correlaciona con la relajación del músculo liso (119) y tiene una implicación importante en varios procesos como la prevención de la agregación de plaquetas, mantener la función del miocito cardíaco, la prevención de la apoptosis tras una

- lesión isquémica o el control de la respuesta en el músculo esquelético a la insulina (120).
- Hsp70 está implicada en la unión de antígenos y su presentación al sistema inmune (121), y pueden ser útiles como adyuvantes inmunológicos en el impulso de la respuesta a una vacuna contra células tumorales (122). Algunos investigadores especulan que algunas HSP pueden estar implicadas en la unión fragmentos de proteínas procedentes de células tumorales y su presentación al sistema inmunológico (123). Por lo tanto HSPs podría ser útil para aumentar la eficacia de vacunas contra el cáncer (124). Algunas HSP están ampliamente expresadas en las células tumorales y resultan esenciales en su supervivencia debido a la presencia de oncogenes mutados y sobreexpresados (122). Muchas HSP también pueden promover la invasividad y la formación de metástasis, bloquear la apoptosis o promover la resistencia a los medicamentos contra el cáncer (125). Así, inhibidores de HSPs, especialmente de Hsp90, son prometedores agentes anticancerígenos (126).
 - El potente inhibidor de Hsp90 17-AAG estaba siendo investigado en ensayos clínicos para el tratamiento de varios tipos de cáncer (cáncer de mama y mieloma múltiple, entre otros), pero por diversas razones (ensayos in vitro limitados principalmente por su toxicidad y los problemas relacionados con la solubilidad y la formulación del fármaco, pero no relacionadas con la eficacia) no pasó a Fase 3 (127). HSPgp96 está siendo investigado ampliamente como un prometedor tratamiento

contra el cáncer y actualmente se encuentra en ensayos clínicos para el cáncer de pulmón no microcítico (128).

Los procesos inflamatorios están mediados por multitud de citoquinas, así la respuesta inflamatoria por radioterapia, puede elevar la concentración plasmática de las mismas tanto durante como después del tratamiento. La investigación de posibles biomarcadores predictivos de la respuesta y/o toxicidad a la radioterapia se ha desarrollado en varios estudios (129-132), incluyendo análisis de dosis sobre volúmenes de tratamiento y biomarcadores circulantes en sangre. Por ejemplo, Zhang et al. publicaron en 2010 un estudio donde se mostró que los paciente con los genotipos CT / TT de rs1800469 TGFβ1 (polimorfismo C-509T) presentaron un riesgo significativamente mayor de esofagitis por RT en comparación con los pacientes con el genotipo CC (133). Sin embargo, estos resultados hacen referencia a toxicidad esofágica aguda, muy prevalente en pacientes que reciben tratamiento con radioquimioterapia (CRT) concurrente por NSCLC, y estos resultados no se han validado con una cohorte de pacientes independiente.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

1. HIPÓTESIS

- Hipótesis principal:

Los polimorfismos de nucleótido simple (SNPs) de los genes del factor de crecimiento transformante- β 1 (TGF- β 1) y Heat Shock Proteins- β 1 (HSP- β 1) son biomarcadores predictivos de supervivencia y toxicidad en pacientes con cáncer de pulmón tratados con Radio(Quimio)terapia.

- Hipótesis específicas:

1. SNPs HSP- β 1 y TGF- β 1 son biomarcadores predictivos de supervivencia, independientemente de otras variables clínicas, patológicas y terapéuticas.
2. SNPs HSP- β 1 y TGF- β 1 son biomarcadores predictivos de toxicidad esofágica (\geq grado 1 según CTCAE v4.03), independientemente de otras variables, especialmente dosimétricas.

2. OBJETIVOS

- Objetivos principales:
 1. Investigar la relación entre los genotipos de los polimorfismos de los genes HSP β 1 y TGF β 1 y el riesgo de toxicidad esofágica y mortalidad.
 2. Validación Prospectiva del Riesgo de Esofagitis en nuestro medio de los estudios retrospectivos realizados recientemente por grupos internacionales en poblaciones asiáticas (Guo et al.) (134) y norteamericanas (Xu et al.) (135).
- Objetivos específicos:
 1. Analizar la asociación de los polimorfismos genéticos estudiados con el riesgo de recurrencia tumoral (locorregional y a distancia) y su impacto sobre la supervivencia global.
 2. Investigar la asociación de los SNPs HSP β 1 y TGF β 1 y el desarrollo de toxicidad esofágica (\geq grado 1 según CTCAE v4.03).
 3. Estudiar la expresión de factor de crecimiento transformante β 1 y Heat Shock Proteins β 1 según los genotipos de polimorfismos de nucleótido simple en pacientes con cáncer de pulmón.

PACIENTES Y MÉTODOS

Para alcanzar los objetivos planteados en este trabajo, diseñamos un estudio analítico, longitudinal, prospectivo y multicéntrico en el cual se seleccionaron pacientes diagnosticados de cáncer de pulmón tratados con radioterapia y/o quimioterapia.

3.1. DECLARACIÓN COMITÉ DE ÉTICA

El presente trabajo es un subestudio del proyecto “Asociación de polimorfismos de nucleótido simple de los genes Tgfb1 y Hspb1 y el riesgo de mortalidad y toxicidad en pacientes con cáncer de pulmón tratados con radio(quimio)terapia.” que fue presentado y aprobado por el Comité de Ética para la investigación clínica del H.G.U. Virgen del Rocío y cumple con los principios de la declaración de Helsinki y la Junta de Revisión Institucional de los Centros participantes. Todos los pacientes dieron y firmaron el consentimiento informado para entrar en el estudio que permitía el empleo de datos clínicos y realizar los estudios moleculares pertinentes con fines de investigación.

3.2. SELECCIÓN DE PACIENTES

Los sujetos de este estudio prospectivo procedían de cinco instituciones diferentes (Hospital General Universitario Virgen del Rocío, Hospital Universitario Virgen de Valme, Hospital Universitario de Cruces, Hospital La Merced (Osuna) y Hospital San Juan de Dios (Bormujos)), reclutados de manera centralizada en el Departamento de Oncología Radioterápica del Hospital General Virgen del Rocío entre enero de 2012 y diciembre de 2016.

3.2.1. Criterios de inclusión:

- Edad mayor de 18 años.
- Estado general con índice de Karnofsky ≥ 60 .
- Diagnóstico anatomopatológico de cáncer de pulmón.
- Indicación de tratamiento con radioterapia torácica a dosis radicales (dosis biológica equivalente ≥ 60 Gy) y/o paliativa con cualquier fraccionamiento.
- Estadios I/II no operables que no reciban tratamiento con radioterapia estereotáxica extracraneal (SBRT).
- Estadio III.
- Estadio IV con oligometástasis que son candidatos a realizar tratamiento radical para las metástasis a distancia y con radioterapia torácica con intención radical.

- Se permite el uso de quimioterapia de inducción previa a la irradiación como neoadyuvancia (por ejemplo, para reducir el volumen tumoral y poder realizar posteriormente un tratamiento con radioterapia sobre un volumen tumoral más reducido que evite mayor irradiación en tejido sano circundante).
- Los pacientes que presentaban recidiva del cáncer de pulmón también se incluyeron si no se había administrado radioterapia previa como primera línea de tratamiento.

3.2.2. Criterios de exclusión

- Pacientes que hayan recibido tratamiento previo con radioterapia torácica.
- Pacientes de sexo femenino que estén embarazadas.
- Rechazo del propio paciente a la cesión de sus datos genéticos y/o la inclusión en el estudio por otro motivo.
- Presencia de otra neoplasia sincrónica activa excepto el cáncer de piel no melanoma.

3.2.3. Variables del estudio

Se tuvieron en cuenta variables clínicas, patológicas, terapéuticas y biológicas/genéticas.

2.2.3.1. Variables clínicas:

- Edad al diagnóstico.
- Sexo.
- Estado general (obtenido mediante el índice de Karnofsky).
- Comorbilidades respiratorias previas (si/no).
- Tipo de comorbilidades respiratorias previas (enfermedad obstructiva crónica, asma, portador de oxígeno domiciliario).
- Comorbilidades digestivas altas previas.
- Tipo de comorbilidades digestivas altas previas (reflujo gastroesofágico, úlcera péptica, y esófago de Barrett).
- Estado nutricional previo a los tratamientos recibidos y valoración del riesgo de desnutrición.
- Hábito tabáquico (fumador actual, exfumador, nunca ha sido fumador).
- Número de paquetes de tabaco-año (se obtiene multiplicando el paquetes consumidos al día por el número de años de fumador).
- Estadío (según la 7ª edición de la American Joint Committee on Cancer).
- Localización del tumor primario (lóbulo superior, medio o inferior y pulmón derecho o izquierdo).
- Presencia de adenopatías patológicas al diagnóstico. Localización estaciones ganglionares afectas.

- Histología del tumor.
- Valoración del grado de toxicidad esofágica tanto aguda como crónica mediante el Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE) versión 4 (v4.03: June 14, 2010). Tabla 7.

ESCALA DE TOXICIDAD ESOFÁGICA CTCAE v4.03	
Grado 0	Ausencia de enfermedad.
Grado 1	Sintomatología mínima (que no requiere uso de medicación) o hallazgos por imagen de daño en ausencia de sintomatología.
Grado 2	Sintomatología moderada requiriendo el uso de medicación para su manejo; problemas para comer/tragar; indicación de suplementos orales.
Grado 3	Sintomatología severa requiriendo en algunos casos ingresos hospitalarios y medidas adicionales a la medicación. Problemas importantes para comer/tragar, indicación de alimentación enteral por sonda, u hospitalización para nutrición parenteral.
Grado 4	Sintomatología grave que amenazan la vida requiriendo hospitalización y medidas de soporte y/o intervención quirúrgica urgente.
Grado 5	Fallecimiento.

Tabla 7. Criterios de clasificación para esofagitis. Adaptado de National Cancer Institute; National Institutes of Health; US Department of Health and Human

Services. Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE); Version 4.03.

2.2.3.2. Variables terapéuticas

- Tipo de tratamiento (radioterapia exclusiva, radioquimioterapia concomitante, quimioterapia de inducción, quimioterapia adyuvante, moléculas diana [ej. erlotinib]).
- Empleo de tratamiento sintomático por toxicidad o de manera profiláctica (uso de corticoides, glutamina u otros complementos nutricionales).
- Dosis de radiación total (Gy).
- Número de fracciones al día.
- Dosis por fracción.
- Tiempo total del tratamiento.
- Número de días de interrupción al tratamiento y la causa.
- Técnica de radiación (conformación tridimensional, irradiación de intensidad modulada, arcoterapia).
- Datos dosimétricos (dosis media, mínima y máxima recibidas en el esófago, dosis absolutas y relativas en los distintos porcentajes del esófago [10%,20%, 30%...], Dosis Biológica Equivalente [BED], volumen total de esófago irradiado en centímetros cúbicos.

2.2.3.3. Variables biológicas/genéticas:

- La selección de polimorfismos de nucleótido simple se ha realizado tras una exhaustiva búsqueda en la base de datos de la National Institute of Environmental Health Sciences (<http://manticore.niehs.nih.gov/snptag.htm>) de aquellos polimorfismos del factor de crecimiento transformante beta 1 (TGFβ1) y Heat Shock Proteins beta 1 (HSPβ1) que tienen una frecuencia del alelo menor (MAF) ≥ 0.05 . Hemos encontrado los siguientes polimorfismos que cumplen este criterio:

- Para el gen TGF-β1: rs11466338, rs11466353, rs1800468, rs1800469, rs4803455, rs8110090, rs8179181, rs11466343 y rs11466344.
- Para el gen HSP-β1: rs2868370, rs2868371, rs7459185 y rs2009836.

2.2.3.4. Variables temporales:

- Supervivencia:

Las variables temporales de supervivencia elegidas para el análisis fueron las que siguen:

- **Supervivencia global (SG):** tiempo entre la fecha de diagnóstico y el fallecimiento o la fecha del último control si no ha fallecido o no se dispone de la fecha de fallecimiento.
- **Supervivencia libre de enfermedad (SLE)** (cualquier recurrencia): tiempo entre la fecha de diagnóstico y la primera recurrencia (loco-

regional o a distancia) o la fecha del fallecimiento o del último control si no ocurre ningún evento.

- **Supervivencia libre de recurrencia loco-regional (SLRLR):** tiempo entre la fecha de diagnóstico y la recurrencia loco-regional dentro y/o fuera del campo de tratamiento de radioterapia o la fecha del fallecimiento o del último control si no ocurre ningún evento.
- **Supervivencia libre de recurrencia a distancia (SLRD):** tiempo entre la fecha de diagnóstico y la recurrencia a distancia o la fecha del fallecimiento o del último control si no ocurre ningún evento.

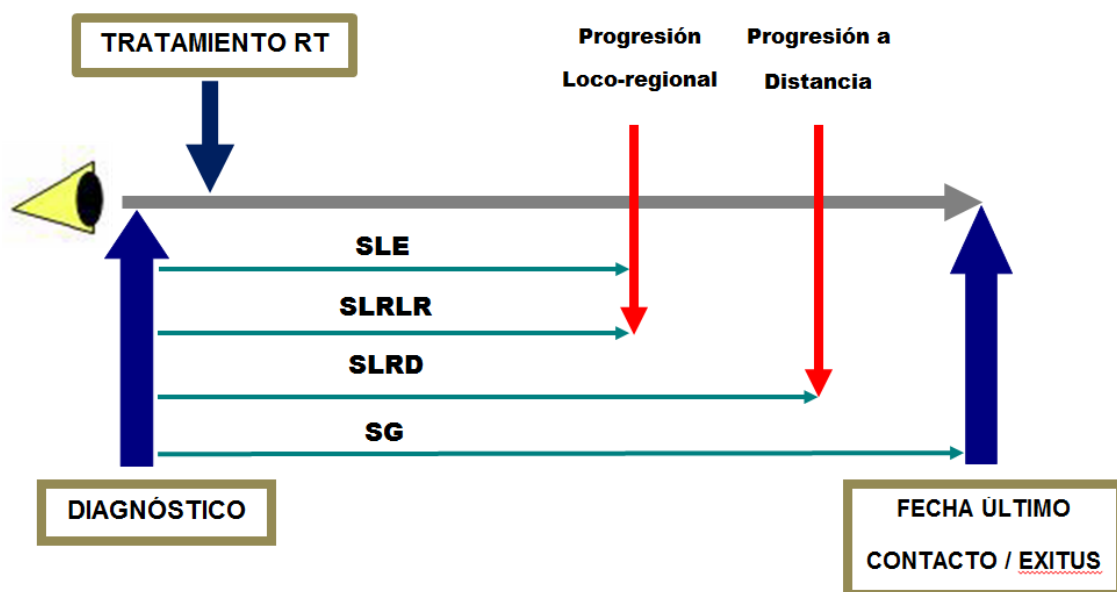


Figura 7. Definición gráfica de las variables temporales de supervivencia.

Los pacientes incluidos para los análisis de supervivencia debieron tener un seguimiento mínimo (tiempo entre el inicio de la RT y el último contacto) de 6 meses.

- Toxicidad:

Analizamos la toxicidad grado ≥ 1 , grado ≥ 2 , grado ≥ 3 , grado ≥ 4 y grado ≥ 5 . La fecha de inicio para el cálculo del tiempo de la toxicidad fue el día de inicio de la radioterapia en todos los casos. La fecha final de este tiempo fue el día del evento (toxicidad esofágica). Los pacientes sin experimentar ningún evento fueron censurados a los 3 meses tras el fin de la radioterapia en el caso de la toxicidad esofágica aguda. La elección de estos puntos de cortes se basa en los criterios de la RTOG sobre toxicidad rádica (136) y que muestran que la toxicidad aguda esofágica tiene lugar generalmente desde la segunda-tercera semana de radioterapia hasta aproximadamente 3 meses tras su finalización.

Por lo tanto, los pacientes vivos incluidos para el análisis de toxicidad esofágica aguda tuvieron un seguimiento mínimo (tiempo entre el inicio de la RT y el último contacto) de 3 meses y los incluidos en el análisis de toxicidad esofágica crónica un mínimo de 6 meses. Los pacientes que fallecieron anteriormente a las mencionadas fechas también se incluyeron en el análisis. Los pacientes se agruparon según sus genotipos.

3.3. RECOGIDA DE DATOS

La recogida de datos clínicos se realizó de manera prospectiva y centralizada en el Servicio de Oncología Radioterapia del Hospital Virgen del Rocío. Para la recogida de datos se llevó a cabo en primer lugar una valoración inicial del paciente, previa al tratamiento con radioterapia de tal manera que se tuviera una referencia basal de la función digestiva. Esta valoración se realizó mediante anamnesis y exploración física. En esa misma visita médica se solicitaban otras pruebas adicionales tales como pruebas de función respiratoria en el caso de la valoración pulmonar así como una valoración por el Servicio de Nutrición para una evaluación del estado nutricional del paciente y estadificación del riesgo de desnutrición. Se tenían reuniones con otros miembros del equipo médico de la unidad de tórax Servicio de Oncología Radioterápica para estudiar dudas y sugerencias relacionadas con la recogida de datos. El periodo de recogida de datos de la toxicidad fue desde el inicio de la radioterapia hasta el último contacto tras la misma. En aquellos pacientes que no acudieron a las consultas de seguimiento, por defunción, cambio de domicilio u otros motivos personales, se realizó seguimiento telefónico valorando estado actual del paciente, tratamiento actualizado y estado de la enfermedad. Se estratificaron los pacientes en vivos sin enfermedad, vivos con enfermedad, fallecidos sin enfermedad y fallecidos con enfermedad, a fecha de la consulta médica o bien del contacto telefónico.

Las visitas de control durante el tratamiento de radioterapia se realizaron con carácter semanal y cada 3 meses durante 2 años tras la radioterapia para valorar la toxicidad aguda y crónica. Posteriormente el seguimiento fue cada 6 meses. Las evaluaciones clínicas se realizaron mediante anamnesis y exploración física. Al menos en los 3 primeros meses se obtuvo una prueba de imagen (Tomografía Computerizada o Tomografía por Emisión de Positrones).

En el caso de la toxicidad esofágica la fecha del evento fue la fecha del inicio del síntoma y no la fecha de la visita de control. Por otro lado, la recogida de datos dosimétricos se consiguió mediante los datos reflejados en los histogramas dosis-volumen, obtenidos a partir de los informes del Servicio de Radiofísica Hospitalaria.

Por último, la recogida de datos genéticos se realizó en el laboratorio del Grupo Adscrito de Oncología Radioterápica asociado al Instituto de Biomedicina de Sevilla. La distribución exacta de los genotipos no fue conocida por los médicos especialistas hasta el momento del análisis de los resultados, con el fin de evitar sesgos en la evaluación clínica de los grados de toxicidad.

3.4. PLANIFICACIÓN EN RADIOTERAPIA

Las técnicas de radioterapia permitidas en el estudio fueron todas en 3D, tanto conformada 3D (RTC3D), intensidad modulada (IMRT) como Volumétrica (VMAT). En todos los casos la planificación del tratamiento radioterápico se

inició con la adquisición de imágenes mediante CT, donde se delimitaron los volúmenes de tratamiento y los tejidos sanos; posteriormente se valoró la distribución de dosis de irradiación (dosimetría), tanto en volúmenes de tratamiento como en los órganos sanos (órganos de riesgo) realizada por el Servicio de Radiofísica.

Para la planificación del tratamiento con radioterapia tridimensional primero tenemos que adquirir las imágenes con el paciente en la misma posición en la que va recibir el tratamiento, esto es, en decúbito supino y con los brazos por encima de la cabeza hacia atrás. Para la inmovilización de los pacientes se emplea un plano con apoyabrazos o colchón de vacío para asegurar la comodidad del paciente (Figura 8).

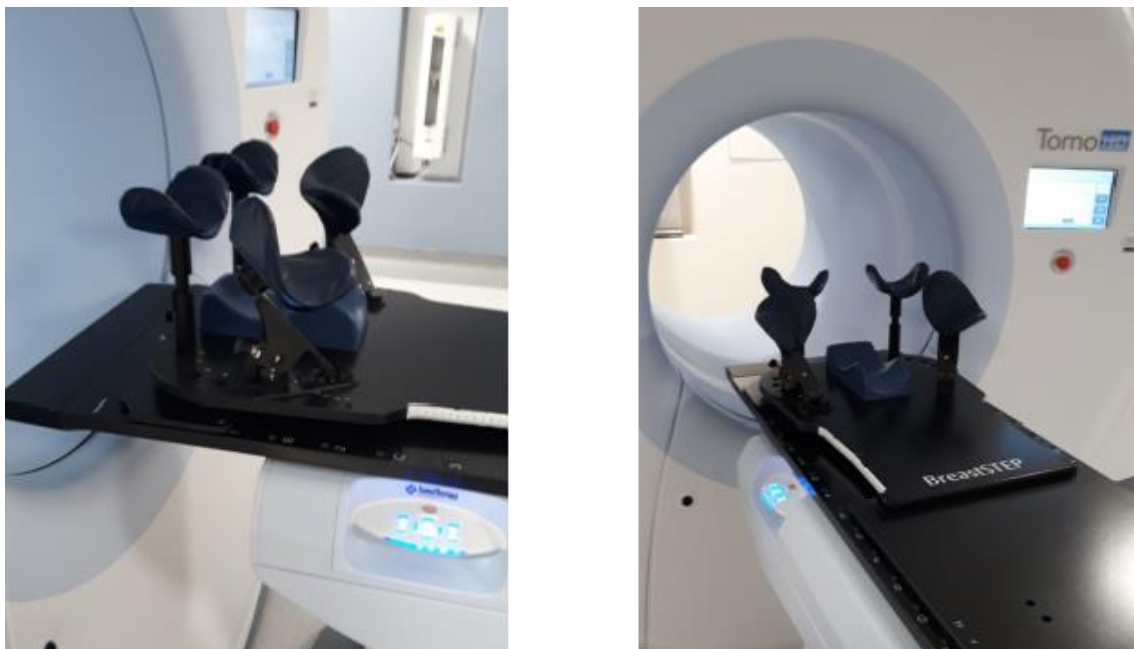


Figura 8. Sistema de inmovilización para radioterapia torácica.

El CT de simulación se realiza en 2 secuencias, una rápida y otra lenta, con un espesor de corte de 2.5 mm. Los límites del CT son cranealmente desde el nivel del atlas (C1) hasta el nivel de la segunda vértebra lumbar (L2) para incluir todo el cuello y los pulmones. Se administró contraste endovenoso según indicación del facultativo. El equipo de adquisición de imágenes CT para todos los pacientes fue Aquilion one™ Vision Edition (Toshiba Medical Systems, Otawara, Japan).

Para la correcta visualización de los volúmenes es imprescindible elegir una ventana específica en el planificador. En este caso la ventana de CT con características de parénquima pulmonar para la lesión primaria y la de mediastino para la delimitación de los órganos de riesgo y las distintas estaciones ganglionares mediastínicas. En concreto en nuestro Servicio están predefinidas dichas ventanas en W 400 UH (Unidades Hounsfield) y L 40 UH para ventana de pulmón y en W 1600 UH y L 600 UH para la ventana de mediastino (292).

Para disminuir la variabilidad interobservador a la hora de la delimitación de volúmenes de tratamiento se realizó la fusión de imagen del CT de simulación con Tomografía de emisión de positrones (PET)-CT realizado para la estadificación tumoral inicial.

Los volúmenes de tratamiento en radioterapia vienen establecidos por guías internacionales, en concreto, seguimos las recomendaciones del ICRU-62 (International Commission on Radiation Units and Measurements) (137), donde

se reflejan las definiciones específicas de los diferentes volúmenes de tratamiento, como se muestran en la Tabla 8 y la figura 9.

DEFINICIÓN DE VOLÚMENES DE TRATAMIENTO		
Volumen		Definición
GTV	Gross Tumor Volume	Enfermedad macroscópica.
CTV	Clinical Target Volume	Expansión del GTV, para incluir la enfermedad subclínica.
ITV	Internal Target Volume	Expansión del CTV, para incorporar específicamente el movimiento del tumor dentro del volumen de tratamiento.
PTV	Planning Target Volume	Expansión del CTV-ITV, para incluir el movimiento del volumen diana, variaciones en la posición y otras incertidumbres. Define el volumen de tratamiento.

Tabla 8. Definición de volúmenes de tratamiento en radioterapia basados en ICRU-62.

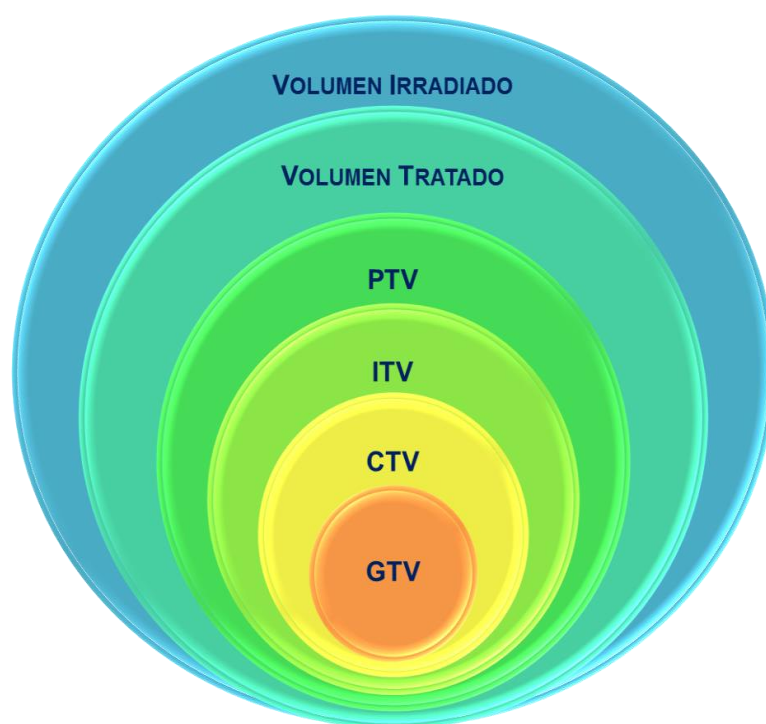


Figura 9. Recomendaciones ICRU 62 para la definición de volúmenes de tratamiento.

Los órganos de riesgo que se deben delimitar son al menos: superficie corporal (contorno del paciente), esófago, corazón, pulmón izquierdo y derecho, ambos pulmones y canal medular (Figura 10). El esófago se contorneó desde el cartílago cricoides hasta la unión gastroesofágica. Esto nos ayuda a valorar las dosis recibidas en cada uno de ellos, comprobar los histogramas de dosis-volumen y así poder aceptar la dosimetría clínica.

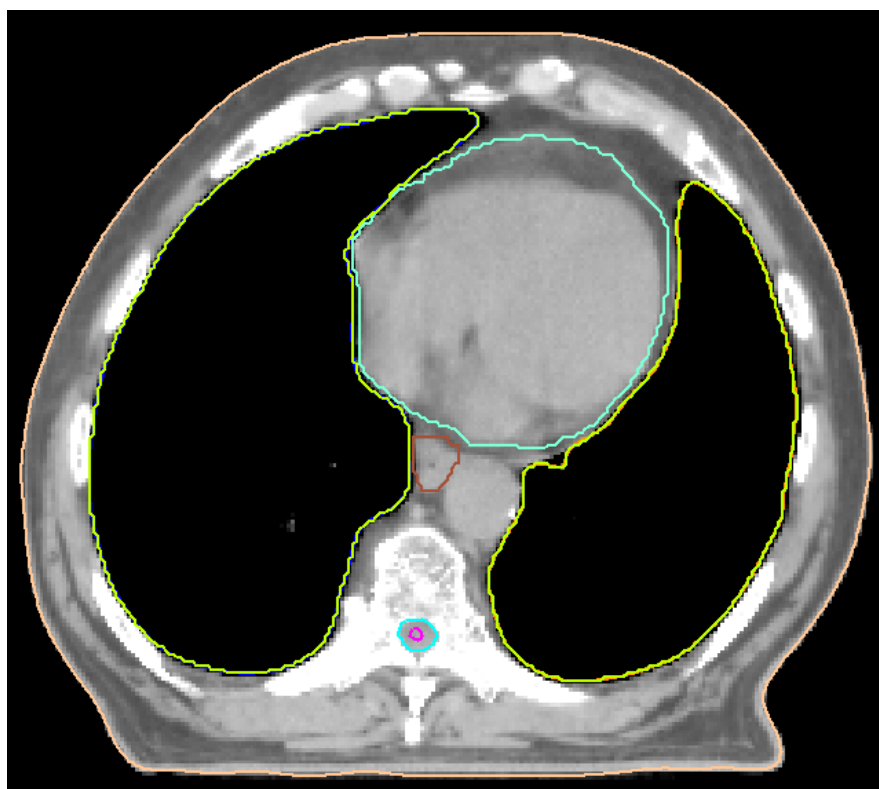


Figura 10. Ejemplo de delimitación de volúmenes de los Órganos de Riesgo según ICRU 62 en un corte del CT de simulación.

La delimitación de los volúmenes de tratamiento se realizaron siguiendo guías de consenso internacionales de la especialidad, en concreto se emplearon las de la asociación americana de Oncología Radioterápica (ASTRO) (138). Actualmente se incluyen como volúmenes de irradiación ganglionar únicamente aquellas áreas clínicamente positivas por pruebas de imagen (CT y/o PET):

- El Volumen Tumoral Macroscópico (gross tumor volume, GTV) será el volumen formado por el tumor primario y las adenopatías patológicas: aquellas mayores de 1 cm en el CT, captación patológica en el PET,

presencia de células tumorales en la biopsia o en la citología tras la realización de la mediastinoscopia o EBUS (Ecografía Endobronquial).

- El Volumen Blanco Clínico (clinical target volume, CTV) sería el volumen definido como GTV añadiendo una expansión isotrópica de 0,5-1 cm.
- El Volumen Blanco de Planificación (planning target volume, PTV) sería el volumen llamado CTV con una expansión de 0,5-1 cm. Hay que tener en cuenta que aquellas lesiones localizadas en vértices pulmonares, el movimiento intrínseco del propio tumor es menor que aquellas situadas en los lóbulos inferiores. Éstos márgenes pueden disminuirse si se emplea radioterapia guiada por la imagen (IGRT).

La prescripción de dosis en RT para los NSCLC con intención radical fue de 60-66 Gy empleando un fraccionamiento convencional (2 Gy fracción).

En los pacientes operados que requieren Radioterapia postoperatoria, los volúmenes se definen igualmente en función de la localización del tumor primario y la extensión de la afectación mediastínica.

Las recomendaciones actuales para la RT postoperatoria son la resección incompleta de la lesión pulmonar y la afectación N2. En pacientes con estadio ganglionar N0 o N1 tras una resección completa del primario la radioterapia no estaría indicada ya que no se ha demostrado una reducción significativa en la recurrencia local.

La situación basal del paciente y la función pulmonar residual deben tenerse en cuenta a la hora de indicar la RT. Los casos se valoran en el comité multidisciplinar donde los cirujanos torácicos valoran el volumen de pulmón remanente y los oncólogos radioterápicos el tejido pulmonar a irradiar. El lecho quirúrgico debe ser identificable por clips y abarcable por un volumen de RT razonable.

La dosis depende de si la enfermedad residual es macroscópica o microscópica.

- RTP postoperatoria (N2): 50 Gy (2 Gy fracción)
- RTP postoperatoria (margen +): 60-66 Gy (2 Gy fracción)
- RTP postoperatoria (extensión extracapsular): 60-66 Gy (2 Gy fracción).

En los casos de SCLC la delimitación de los volúmenes en RT es similar, lo único que cambiaría serían las dosis de prescripción. Para los estadios con enfermedad limitada al tórax está indicada la Radioterapia torácica. Si se administra después de la QT, se debe incluir el volumen tumoral postquimioterapia y las áreas ganglionares afectadas al diagnóstico. Las dosis de prescripción de RT es 45 Gy a 1,5 Gy/fracción, dos fracciones al día, separadas al menos 6 horas, o bien dosis ≥ 50 Gy a un fraccionamiento convencional, 2 Gy/fracción, 1 fracción al día, 5 días a la semana.

En cuanto a la Radioterapia Holocraneal Profiláctica (Prophylactic Cranial Irradiation, PCI) sólo se debe realizar si no hay evidencia de progresión tras

haber finalizado el tratamiento quimioterápico. Las dosis en estos casos son de 25 Gy en 10 sesiones diarias de 2,5 Gy. Desde Noviembre de 2014 nuestro centro participa en el ensayo clínico PREMER en el que la PCI incluye en su rama experimental la preservación del hipocampo por el elevado riesgo de neurotoxicidad (139). Se trata de un estudio fase III que valora la PREservación de la MEMoria tras la irradiación craneal profiláctica con o sin protección del hipocampo en pacientes diagnosticados de cáncer de pulmón de célula pequeña.

En pacientes con enfermedad extensa no hay evidencia de que la RT torácica pueda ser incluida en la práctica diaria de inicio, aunque se podría valorar en pacientes con buen performance status y con persistencia de enfermedad a nivel torácico que hayan tenido una respuesta completa a nivel metastásico. El fraccionamiento realizado en estos casos incluye los esquemas 30 Gy a 3 Gy/sesión y 60 Gy a 2 Gy/sesión.

Los cálculos dosimétricos fueron realizados mediante el programa informático Oncentra Master Plan (Nordion AB, Nucletron, Veenendaal, Holanda), Eclipse (Version 11, Varian Medical Systems, Palo Alto, CA) y Pinnacle TPS (Philips Radiation Oncology Systems, Fitchburg, WI). Se emplearon energías de 6-10 MV.

Los niveles limitantes de dosis empleados para cada uno de los diferentes órganos de riesgo (OAR): corazón, médula, pulmón izquierdo y derecho, pulmones y esófago, fueron los establecidos por QUANTEC (QUantitative Analysis of Normal Tissue Effects in the Clinic) (52). El plan de tratamiento se

optimizaba para intentar ajustar la dosis a administrar al PTV y minimizando la dosis que les llegue a los OAR (Tabla 9).

ÓRGANO	VOLUMEN	TIPO RT	OBJETIVO	DOSIS (Gy) o PARÁMETROS DE DOSIS/VOLUMEN	RATIO (%)
Pulmón	Órgano entero	RTC3D	Neumonitis Sintomática	$V20 \leq 30\%$ Dosis Media = 7 Dosis Media = 13 Dosis Media = 20 Dosis Media = 24 Dosis Media = 27	< 20 5 10 20 30 40
Esófago	Órgano entero	RTC3D	Esofagitis Aguda Grado ≥ 3 Esofagitis Aguda Grado ≥ 2 Esofagitis Aguda Grado ≥ 2 Esofagitis Aguda Grado ≥ 2	Dosis Media < 34 $V35 < 50\%$ $V50 < 40\%$ $V70 < 20\%$	5–20 < 30 < 30 < 30
Corazón	Pericardio	RTC3D	Pericarditis	Dosis Media < 26 $V30 < 46\%$	< 15 < 15
	Órgano entero	RTC3D	Mortalidad cardíaca tardía	$V25 < 10\%$	< 1

Médula	Parcial	RTC3D	Mielopatía	Dmax = 50	0.2
				Dmax = 60	6
				Dmax = 69	50

Tabla 9. Restricciones de dosis y volumen en el tejido normal para la RT con fraccionamiento convencional. Extraído del estudio Marks et al. (93).

3.5. EVALUACIÓN DEL PACIENTE Y SEGUIMIENTO

Durante el curso de la radioterapia, los pacientes fueron valorados al menos semanalmente en el Servicio de Oncología Radioterápica de cada Centro reclutador, y más a menudo si era necesario para la evaluación clínica y el control de síntomas de la enfermedad y/o toxicidad aguda derivada del tratamiento y comprobar la tolerancia al mismo. En cada revisión se clasificaba la toxicidad según las escalas CTCAE v4.03. La toxicidad se obtuvo prospectivamente por los médicos y todos los casos se revisaron retrospectivamente con el fin de mantener la coherencia en la definición de toxicidad y aportar consistencia a los datos obtenidos. Tras el término de la radioterapia, los pacientes continuaban visitas médicas a las 3-4 semanas para el control de la toxicidad objetivada y una vez resuelta, se seguían a intervalos de 3 meses los primeros 2 años y posteriormente cada 6 meses.

Las consultas de seguimiento consistieron en una anamnesis y exploración física, así como de pruebas de imagen como la tomografía computarizada (CT)

y el PET, según el criterio facultativo. También se realizaron esofagogramas con contraste oral y/o endoscopias digestivas altas si estaba clínicamente indicado.

3.6. MÉTODO DE GENOTIPADO Y SELECCIÓN DE SNP

El DNA genómico se aisló a partir de una muestra de sangre periférica de 6 ml utilizando el kit DNeasy® Blood and Tissue (Qiagen, Hilden, Alemania) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Las concentraciones de DNA y la pureza se determinaron mediante medición espectrofotométrica de la absorbancia a 260 y 280 nm mediante el espectrofotómetro UV-Vis NanoDrop 2000 (Nano Drop Technologies, Wilmington, DE, USA).

Para el estudio, se consultó la base de datos de SNPs del Programa del Genoma del National Institute of Environmental Health Sciences y la literatura relacionada usando la herramienta de selección de LD TAG SNP (TagSNP) (<https://snpinf.niehs.nih.gov/snpinf/snpitag.html>). Los SNP seleccionados cumplieron al menos dos de los siguientes criterios:

1. Una frecuencia alelo menor de al menos 5%.
2. Estar ubicado en el promotor o región reguladora o no traducida del gen.
3. Disponibilidad a través de Taqman® SNP Genotyping Assay.

Los polimorfismos de nucleótido simple seleccionados finalmente fueron: rs11466338, rs11466353, rs1800468, rs1800469, rs4803455, rs8110090, rs8179181, rs11466343 y rs11466344 del gen TGF- β 1. Por otra parte, los SNPs analizados del gen HSP- β 1 fueron: rs2868370, rs2868371, rs7459185 y rs2009836.

Además, tres SNPs de TGF- β 1 y HSP- β 1 asociados en otras series con el desarrollo de RIET se han seleccionado para su validación: rs1800469, rs2868371 y rs2868370.

Todos los genotipos se obtuvieron mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real en el sistema Viia7 Real Time PCR (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) utilizando los estudios de genotipificación SNP TaqMan® (Tabla 10). Las condiciones generales de PCR utilizadas para los experimentos fueron 60°Cx30", [95°Cx10', 95°Cx15", 60°Cx1', 60°Cx30"] x40.

GEN	SNP	Cr	POSICIÓN Cr	ALELOS	TIPO DE VARIACIÓN DEL SNP	MAF
TGF β 1	rs11466338	19	41339896	T/C	Variante intrón	C=0.0601/301
	rs11466344	19	41339408	C/T	Variante intrón	T=0.1258/630
	rs4803455	19	41345604	C/A	Variante intrón	A=0.4772/2390
	rs11466353	19	41333933	G/T	Variante intrón	T=0.0174/87
	rs1800468	19	41354682	C/T	3'UTR	T=0.0413/207

	rs1800469	19	41354391	A/G	Variante Upstream 2KB	A=0.3680/1843
	rs11466343	19	41339550	C/T	Variante intrón	T=0.0327/164
	rs8110090	19	41339967	A/G	Variante intrón	G=0.0952/477
	rs8179181	19	41332301	G/A	Variante intrón	A=0.0761/381
HSPβ1	rs2009836	7	76301843	T/C	Variante Upstream 2KB	C=0.4529/2268
	rs2868370	7	76301483	G/A	Variante Upstream 2KB	A=0.1454/728
	rs2868371	7	76301442	C/G	Variante Upstream 2KB	G=0.3017/1511
	rs7459185	7	76305323	G/C	Intergénica	C=0.2829/1417

Tabla 10. Genes seleccionados y polimorfismos de un solo nucleótido en este estudio. *

* Información obtenida de acuerdo con la base de datos NCBI SNPs (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>) Cr: Cromosoma. MAF: frecuencia alelo menor.

3.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los análisis de datos estadísticos se realizaron con el software estadístico SPSS (versión 19.0). Los objetivos del análisis de toxicidad (desarrollo de RIET aguda y tardía) se calcularon y calificaron utilizando los Criterios de

terminología común para eventos adversos versión 4.3 (Tabla 7). Se definió el día del inicio de la radioterapia como el punto de inicio para el cálculo del tiempo hasta el desarrollo de los diferentes eventos; los pacientes que no experimentaron ningún evento se censuraron a los 3 meses desde que comenzó la radioterapia en el caso del objetivo de toxicidad aguda y en el momento del fallecimiento o el último contacto para el resto de objetivos. Para el objetivo de supervivencia se definió la fecha de inicio para cada paciente la fecha del diagnóstico anatómico-patológico.

Para el análisis estadístico, los pacientes se agruparon de acuerdo con sus genotipos. La prueba de χ^2 se utilizó para comparar las variables categóricas entre los diferentes grupos. Las variables continuas se dividieron en dos grupos utilizando la mediana como punto de corte. Con el fin de evaluar la influencia de los genotipos en la supervivencia y en el riesgo de desarrollar RIET, se realizó un análisis de riesgos proporcionales de Cox para calcular la razón de riesgo (Hazard Ratio, HR) y el intervalo de confianza (IC) de cada genotipo. Se realizó un análisis univariante para determinar la asociación entre los distintos factores clínicos y terapéuticos y el consecuente riesgo de muerte y el riesgo de desarrollar RIET. Además, se llevó a cabo un análisis multivariante mediante un modelo de riesgos proporcionales de Cox para ajustar por otras covariables que podrían haber resultado ser confusoras en el análisis univariante. El análisis de Kaplan-Meier se realizó para estimar la probabilidad acumulada de supervivencia (SLE y SG) y RIET. La supervivencia se analizó de manera separada en pacientes con cáncer de pulmón no microcítico y

microcítico. En los casos de recaídas, la fecha de referencia de inicio para los análisis de supervivencia fue la fecha de diagnóstico. También calculamos la sensibilidad y la especificidad con el modelo de regresión logística resultante mediante la construcción de curvas ROC (Receiver Operating Characteristic) y luego calculamos el valor estadístico del área bajo la curva (AUC) para estimar la capacidad de cada modelo para predecir la supervivencia así como el desarrollo de RIET. Un valor de p de 0,05 o menor se consideró estadísticamente significativo.

3.8. VALIDACIÓN PROSPECTIVA DEL RIESGO DE ESOFAGITIS

Se ha llevado a cabo una validación prospectiva la asociación de SNPs y el riesgo de esofagitis en pacientes de nuestro medio. Hasta la fecha no se ha realizado una validación prospectiva clínica de estas características en pacientes europeos. Lo publicado hasta la fecha son estudios retrospectivos realizados por grupos internacionales en poblaciones asiáticas (134) y norteamericanas (135).

RESULTADOS

4.1. CARACTERÍSTICAS DE LOS PACIENTES

Las características clínico-patológicas de los 247 pacientes incluidos en el estudio se enumeran en la Tabla 11. Según la clasificación de tumores malignos (TNM) (7ª Ed), 25 pacientes (10,1%) fueron estadios I-II, 92 (37.2%) estadio IIIA, 107 (43.4%) estadio IIIB y 23 (9.3%) estadio IV. De acuerdo con la clasificación histopatológica, hubo 69 (28%) adenocarcinoma, 102 (41.3%) carcinoma de células escamosas, 8 (3.2%) NSCLC, 9 (3.6%) no especificado y 57 (23.4%) SCLC. La mediana de tiempo de seguimiento para todos los pacientes fue de 14 meses (rango, 1 a 88 meses). Los pacientes que fallecieron o progresaron antes de los 3 meses desde el inicio de la radioterapia (n = 31) no se incluyeron en el análisis de la evaluación de toxicidad tardía.

VARIABLES	PACIENTES (%) N= 247
Género	
Mujer	34 (14)
Hombre	213 (86)
Edad, años	
Mediana (rango)	65 (35-88)

Tratamiento	
Tumor primario	195 (79)
Recaída	18 (7.3)
Paliativo	34 (13.7)
Hábito tabáquico	
Actual	126 (51)
Exfumador	111 (45)
Nunca	10 (4)
No. de cigarrillos por día	
Mediana (rango)	30 (3-100)
No. de paquetes-año ^a	
Mediana (rango)	63 (1.5-275.15)
Historia de disfagia	
No	234 (94.7)
Sí	13 (5.3)
Historia de pérdida de peso	
No	196 (79.3)
	51 (20.7)
KPS	
≥80	187 (75.7)
<80	60 (24.3)
Peso antes de RT, Kg	
Mediana (rango)	75 (50-93.3)

Histología	
Células escamosas	102 (41.3)
Adenocarcinoma	69 (28)
Carcinoma de células grandes	8 (3.2)
NSCLC, NOS	10 (4)
SCLC	57 (23.1)
Sarcoma	1 (0.5)
Estadio clínico	
I	13 (5.3)
II	12 (4.8)
IIIA	92 (37.2)
IIIB	107 (43.3)
IV	23 (9.4)
Cirugía	
No	208 (84.2)
Sí	39 (15.8)
Tratamiento de Radioterapia, días	
Mediana (rango)	45 (1-127)
Dosis total de radiación, Gy	
Mediana (rango)	60 (2-70)
Fraccionamiento de Radioterapia	
Una vez al día (ref)	228 (85.4)
Dos veces al día	19 (18.6)

CRT concomitante	
No	140 (56.7)
Sí	107 (43.3)

Tabla 11. Características clínico-patológicas de los pacientes. Abreviaturas: KPS, Karnofsky Performance Status; RT, Radioterapia; NSCLC, NOS, cáncer de pulmón no microcítico, no especificado; Gy, Gray; CRT, Radioquimioterapia.

^a Número de años de paquete = (paquetes ahumados por día) x (años como fumador).

En cuanto a los valores dosimétricos destacan un volumen macroscópico (GTV) de 74.54 cc de mediana con un volumen de tratamiento (PTV) mediano de 357.22 cc. Una mediana de dosis mínima, máxima y media a esófago de 0.7, 61.58 y 21.90 Gy, respectivamente. Una mediana de V35 de 32.92 Gy, un V50 de 15.37 Gy y una mediana de V70 de 0. Las variables dosimétricas quedan recogidas en la tabla 12:

VARIABLES	VALORES (RANGO) N= 247
PTV (cc)	
Mediana (rango)	357.22 (23.63-1468.54)
CTV (cc)	
Mediana (rango)	176.22 (7.51-1100)
GTV (cc)	
Mediana (rango)	74.54 (0.98-595.82)

Volumen de esófago (cc)	
Mediana (rango)	28.58 (7-94.43)
D _{min} de esófago, Gy	
Mediana (rango)	0.7 (0.11-15.44)
D _{max} de esófago, Gy	
Mediana (rango)	61.58 (7.21-75.7)
MED, Gy	
Mediana (rango)	21.9 (0.91-60.14)
Dosis mediana de esófago	
Mediana (rango)	12.25 (0.29-65.18)
V ₅	
Mediana (rango)	56.63 (1.47-100)
V ₁₀	
Mediana (rango)	51 (0.07-100)
V ₁₅	
Mediana (rango)	47 (0.09-100)
V ₂₀	
Mediana (rango)	43 (0.04-98.43)
V ₂₅	
Mediana (rango)	40 (0.02-97.41)
V ₃₀	
Mediana (rango)	37 (0.02-93.83)
V ₃₅	
Mediana (rango)	32.92 (0.09-92.04)
V ₄₀	
Mediana (rango)	28.07 (0.24-89.23)
V ₄₅	
Mediana (rango)	21.64 (0.09-80)
V ₅₀	
Mediana (rango)	15.37 (0.78-79)
V ₅₅	
Mediana	9 (0.07-76)
V ₆₀	
Mediana (rango)	4 (0.15-74)
V ₆₅	
Mediana (rango)	2 (0.01-56)

V ₇₀	
Mediana (rango)	0 (0.01-54)

Tabla 12. Características dosimétricas de los pacientes. Abreviaturas: PTV, planning target volume; CTV, clinical target volume; GTV, gross tumor volume; Dmin, dosis mínima; Dmax, dosis máxima; MED, dosis media de esófago; Vx, volumen de esófago normal que recibe X Gy o más.

4.2. SUPERVIVENCIA

4.2.1. CORRELACIÓN ENTRE SUPERVIVENCIA Y LOS SNPs

SELECCIONADOS.

Para identificar qué factores de riesgo se correlacionaron con el resultado obtenido se realizó un análisis univariante. Todas las variables clínico-patológicas de los pacientes que incluyen sexo, edad, escala funcional de Karnofsky (KPS), histología tumoral, estadio de la enfermedad, tabaquismo, quimioterapia, cirugía previa o dosis de RT y su asociación con la supervivencia se resumen en los siguientes apartados.

El tiempo medio de seguimiento para todos los 247 pacientes fue 20.71 meses (rango 0.74–168.41 meses). Al momento del análisis, se habían producido 83 muertes y 164 pacientes seguían vivos.

4.2.1.1. SUPERVIVENCIA GLOBAL

Características clínico-patológicas y SG.

La prueba de log-rank mostró que las variables: índice de Karnofsky, estadio clínico y la cirugía se asociaron de manera estadísticamente significativa con la supervivencia global para aquellos pacientes diagnosticados de NSCLC. Pacientes con KPS ≤ 80 presentaron peor supervivencia con un HR de 1.69 (IC 95 % 1.1-2.54, $p= 0.01$); los estadios avanzados (E. III-IV) mostraron, de igual manera, un HR de 1.56 (IC 95% 1.04-2.35, $p= 0.03$). La cirugía por otro lado demostró ser un factor “protector” para la supervivencia con un HR de 0.43 (IC 95% 0.23-0.79, $p= 0.01$). No se hallaron diferencias significativas en la SG con el resto de variables clínico-patológicas de estos pacientes ni para los SCLC ($p > 0.05$) (Tabla 13).

SUPERVIVENCIA GLOBAL (N= 247)						
Histología	NSCLC			SCLC		
Parámetro	HR	C 95%	p valor	HR	IC 95%	p valor
Género						
Mujer (ref)	1.00			1.00		
Hombre	1.51	0.79-2.92	0.22	0.72	0.29-1.77	0.47

Edad, años						
≤65 (ref)	1.00			1.00		
>65	1.50	0.99-2.25	0.05	1.22	0.60-2.60	0.60
Estado Fumador						
Ex-Fumador/Nunca (ref)	1.00			1.00		
Activo	0.70	0.46-1.06	0.09	1	0.44-2.25	1
No. de cigarros/día						
≤30 (ref)	1.00			1.00		
>30	1.42	0.93-2.18	0.11	0.72	0.35-1.47	0.37
No. paquetes año ^a						
≤63 (ref)	1.00			1.00		
>63	1.14	0.75-1.73	0.55	0.90	0.43-1.85	0.77
Historia pérdida peso						
No (ref)	1.00			1.00		
Si	0.77	0.40-1.48	0.43	1.16	0.51-2.62	0.72
Historia de alcoholismo						
No (ref)	1.00			1.00		
Si	1.44	0.91-2.28	0.12	0.56	0.26-1.23	0.15
Historia de disfagia						
No (ref)	1.00			1.00		
Si	0.63	0.20-2.01	0.43	1.46	0.43-4.95	0.54
KPS	1.00			1.00		
>80 (ref)	1.69	1.12-2.54	0.01	1.63	0.79-3.35	0.18

≤80						
Estadio Clínico						
I-II (ref)	1.00			1.00		
III-IV	1.56	1.04-2.35	0.03	2.07	0.91-4.67	0.08
Cirugía						
No (ref)	1.00			1.00		
Si	0.43	0.23-0.79	0.01	2.70	0.36-20.49	0.34
Tratamiento RT, días						
≤45 (ref)	1.00			1.00		
>45	1.15	0.73-1.82	0.54	1.30	0.62-2.74	0.49
Dosis total RT, Gy						
≤60 (ref)	1.00			1.00		
>60	0.91	0.58-1.42	0.67	0.97	0.43-2.19	0.94
Fraccionamiento RT						
Una vez al día (ref)	1.00			1.00		
Dos veces al día	4.93	0.67-36.36	0.12	0.60	0.27-1.34	0.21
CRT Concomitante						
No (ref)	1.00			1.00		
Si	0.90	0.59-1.37	0.61	0.67	0.32-1.4	0.29

Tabla 13. Asociación entre características clínico-patológicas y la Supervivencia Global. Abreviaturas: NSCLC, non-small-cell lung carcinoma; SCLC, small-cell lung carcinoma; KPS, Karnofsky Performance Status; RT, Radioterapia; CRT, Quimio-radioterapia;

^a Número de paquetes-año = (paquetes fumados por día) x (años como fumador).

Características dosimétricas y SG.

La mayoría de variables dosimétricas resultaron estadísticamente significativas para NSCLC, tanto las referentes a volúmenes de tratamiento (GTV, CTV y PTV), así como las dosis media, mínima y máxima en esófago. Estos valores reflejan la asociación entre volúmenes tumorales grandes y peor supervivencia ya que se asocia a mayor carga tumoral. Para los pacientes de SCLC las variables significativas han sido la dosis media, mediana y mínima en el esófago y algunos volúmenes de esófago asociados a una determinada dosis. Estos volúmenes que reciben una determinada dosis son los que valoramos en una dosimetría física a través de los histogramas dosis/volumen. Y estas referencias específicas han sido las significativas en estos pacientes: V5, V10, V20, V30 y V45 ($p < 0.004$) (Tabla 14).

SUPERVIVENCIA GLOBAL (N= 247)						
Histología	NSCLC			SCLC		
Parámetro	HR	IC 95%	p valor	HR	IC 95%	p valor
PTV, cc ^a	1.002	1.001-1.003	<0.001	1.001	1.001-1.002	0.06
PTV med	1.96	1.28-3	0.002	2.35	1.07-5.14	0.03
PTV D98	1.04	1.007-1.06	0.01	1.02	0.98-1.06	0.38

PTV D98 med	2.51	1.52-4.14	<0.001	1.25	0.57-2.73	0.58
CTV, cc ^a	1.003	1.001-1.004	<0.001	1.001	0.998-1.002	0.90
CTV med	2.69	1.62-4.47	<0.001	1.67	0.77-3.67	0.20
CTV D98	1.04	0.997-1.08	0.07	1.02	0.98-1.07	0.38
CTV D98 med	1.52	0.85-2.70	0.16	1.28	0.55-2.98	0.56
GTV, cc ^a	1.003	1.001-1.01	0.01	1.001	0.99-1.01	0.94
GTV med	1.81	1.11-2.97	0.02	2.35	0.91-6.09	0.08
GTV D98	1.04	0.997-1.09	0.07	1.001	0.95-1.05	1
GTV D98 med	1.03	0.61-1.74	0.91	0.83	0.29-2.38	0.73
Volumen de esófago	1.002	0.99-1.02	0.79	1.02	0.98-1.06	0.25
Volumen de esófago med	1.09	0.72-1.65	0.68	1.31	0.63-2.71	0.48
D _{min} de esófago ^a	1.07	0.98-1.16	0.13	1.32	1.10-1.58	0.003
D _{min} de esófago med	1.82	1.18-2.82	0.01	1.85	0.88-3.88	0.11
D _{max} de esófago ^a	1.02	1.003-1.04	0.03	1.02	0.99-1.04	0.38
D _{max} de esófago med	1.84	1.13-3	0.01	1.12	0.52-2.41	0.77
MED ^a	1.03	1.01-1.04	0.001	1.05	1.01-1.10	0.02
MED ^a med	1.70	1.01-2.65	0.02	1.71	0.82-3.57	0.15
Dosis Mediana de esófago ^a	1.02	1.01-1.03	<0.001	1.03	1-1.06	0.03
Dosis Mediana de esófago med ^a	2.30	1.48-3.56	<0.001	1.75	0.84-3.65	0.13

V ₅ ^a	1.02	1.01-1.04	0.001	1.04	1.01-1.07	0.003
V ₅ med	1.87	1.20-2.92	0.01	2.90	1.34-6.26	0.01
V ₁₀ ^a	1.02	1.01-1.03	<0.001	1.04	1.02-1.07	0.002
V ₁₀ med	1.79	1.15-2.78	0.01	2.06	0.95-4.46	0.07
V ₁₅ ^a	1.02	1.01-1.03	0.001	1.01	0.989-1.03	0.44
V ₁₅ med	1.66	1.08-2.56	0.02	1.49	0.69-3.19	0.31
V ₂₀ ^a	1.02	1.01-1.03	0.001	1.03	1.003-1.05	0.03
V ₂₀ med	1.80	1.17-2.77	0.01	2.10	0.98-4.50	0.06
V ₂₅ ^a	1.02	1.01-1.03	0.001	1.03	1.001-1.05	0.04
V ₂₅ med	1.87	1.21-2.90	0.01	2.06	0.95-4.45	0.07
V ₃₀ ^a	1.02	1.01-1.03	0.001	1.03	1.001-1.05	0.045
V ₃₀ med	1.79	1.16-2.77	0.01	2.06	0.95-4.45	0.06
V ₃₅ ^a	1.02	1.01-1.03	<0.001	1.03	1.01-1.05	0.05
V ₃₅ med	1.93	1.24-3.01	0.003	1.57	0.74-3.32	0.24
V ₄₀ ^a	1.02	1.01-1.03	<0.001	1.02	0.999-1.05	0.06
V ₄₀ med	1.69	1.10-2.62	0.02	1.54	0.72-3.26	0.26
V ₄₅ ^a	1.02	1.01-1.03	<0.001	1.03	1.001-1.05	0.04
V ₄₅ med	1.79	1.15-2.70	0.01	1.74	0.82-3.68	0.15
V ₅₀ ^a	1.02	1.01-1.03	<0.001	1.01	0.987-1.04	0.35
V ₅₀ med	1.96	1.23-3.12	0.004	1.60	0.76-3.39	0.22
V ₅₅ ^a	1.02	1.01-1.03	0.001	1.00	0.97-1.04	0.81
V ₅₅ med	2.37	1.47-3.83	<0.001	1.41	0.66-3.03	0.38
V ₆₀ ^a	1.01	1.01-1.03	0.05	0.99	0.95-1.04	0.74

V ₆₀ med	1.99	1.26-3.12	0.003	1.21	0.55-2.63	0.64
V ₆₅ ^a	1.01	0.99-1.02	0.50	1.03	0.96-1.10	0.46
V ₆₅ med	1.51	0.99-2.32	0.06	1.77	0.81-3.87	0.15
V ₇₀ ^a	0.99	0.97-1.02	0.64	1.06	0.96-1.17	0.26
V ₇₀ med	0.89	0.58-1.35	0.58	1.12	0.52-2.41	0.77

Tabla 14. Asociación entre características dosimétricas relacionadas con el tratamiento radioterápico y la Supervivencia Global. Abreviaturas: NSCLC, non-small-cell lung carcinoma; SCLC, small-cell lung carcinoma; GTV, gross tumor volume; CTV, clinical target volume; PTV, planning target volume; MED, dosis media de esófago; Dmin de esófago, la dosis mínima de esófago; Dmax del esófago, la dosis máxima de esófago; V(x), volumen del esófago normal que recibe X Gy o más radiación; V (x) med, volumen medio del esófago normal que recibe X Gy o más radiación.

^a Los parámetros dosimétricos se analizaron como variables continuas.

Análisis Multivariante

El modelo de riesgos proporcionales de Cox se utilizó para evaluar la asociación de las variables clínico-patológicas-terapéuticas y biológicas con la SG. Para el análisis multivariante se realizó un ajuste de las variables significativas del análisis univariante por edad, KPS, estadio clínico, cirugía, volumen PTV y dosis mediana al esófago. Tras la realización del modelo de riesgos proporcionales de Cox “paso atrás”, aún mantenían la asociación estadísticamente significativa con el KPS, la cirugía, la dosis media en esófago

y el volumen PTV ($p = <0.001$, 0.01, 0.02 y 0.01, respectivamente) para pacientes NSCLC. Únicamente la dosis media en esófago mantenía la significación estadística en pacientes SCLC (HR= 1.05, IC 95% 1.01-1.1, $p=0.03$) (Tabla 15).

SUPERVIVENCIA GLOBAL (N= 247)						
Histología	NSCLC			SCLC		
Parámetro	HR	IC 95%	p valor	HR	IC 95%	p valor
KPS						
>80 (ref)	1.00					
≤80	2.20	1.42-3.42	<0.001			
Cirugía						
No (ref)	1.00					
Si	0.43	0.22-0.83	0.01			
Dosis Mediana						
Esófago	1.02	1.003-1.04	0.02	1.05	1.01-1.1	0.02
Volumen PTV, med (cc)						
≤339.5 (ref)	1.00					
>339.5	1.87	1.17-2.97	0.01			
rs11466353 (<i>TFGβ1</i>)						
AA/CA (ref)	1.00			1.00		
CC	0.89	0.46-1.73	0.74	1.19	0.36-3.96	0.77
rs7459185 (<i>HSPβ1</i>)						
GG/GC (ref)	1.00			1.00		
CC	1.29	0.86-1.95	0.22	2.53	1.23-5.18	0.01

Tabla 15. Análisis multivariante utilizando un modelo de análisis de riesgos proporcionales de Cox con un procedimiento de eliminación “paso atrás” de factores asociados con la Supervivencia Global. Abreviaturas: NSCLC, non-small-cell lung carcinoma; SCLC, small-cell lung carcinoma; KPS, Karnofsky Performance Status.

Las curvas de Kaplan-Meier para la supervivencia global reflejan un claro beneficio en los pacientes operados. En concreto presentaron una mediana de supervivencia de 30.3 meses frente a los 16.5 meses en pacientes NSCLC no intervenidos (HR= 2.43, IC 95% 14.60-24.14, $p= 0.01$, Figura 11). Los pacientes NSCLC con KPS $>80\%$ también mostraron mejor mediana de supervivencia respecto a los pacientes con KPS ≤ 80 (23.9 frente 14.5 meses, $p= 0.01$, Figura 12). Respecto a los volúmenes de tratamiento en pacientes NSCLC, grandes volúmenes de PTV medido en centímetros cúbicos (cc) presentaron peor supervivencia, de manera estadísticamente significativa, en comparación con aquellos volúmenes más pequeños que la mediana (339.5 cc) (29.9 frente 14.6 meses, $p= 0.01$, Figura 13), como una extrapolación del estadiaje de la enfermedad.

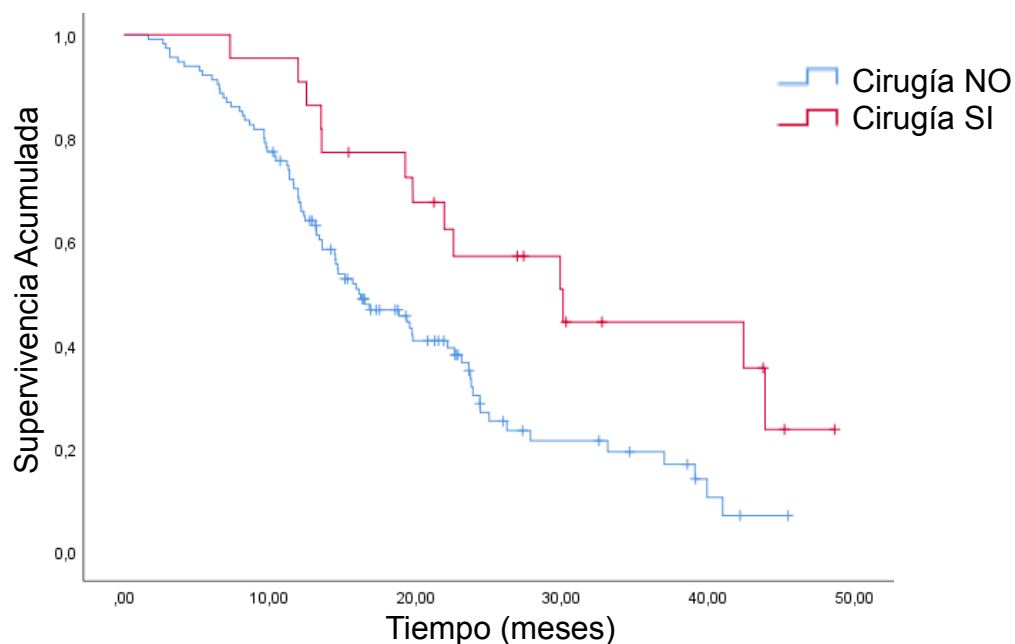


Figura 11. Comparación del tiempo de supervivencia entre pacientes SCLC sometidos a cirugía y aquéllos que no fueron intervenidos.

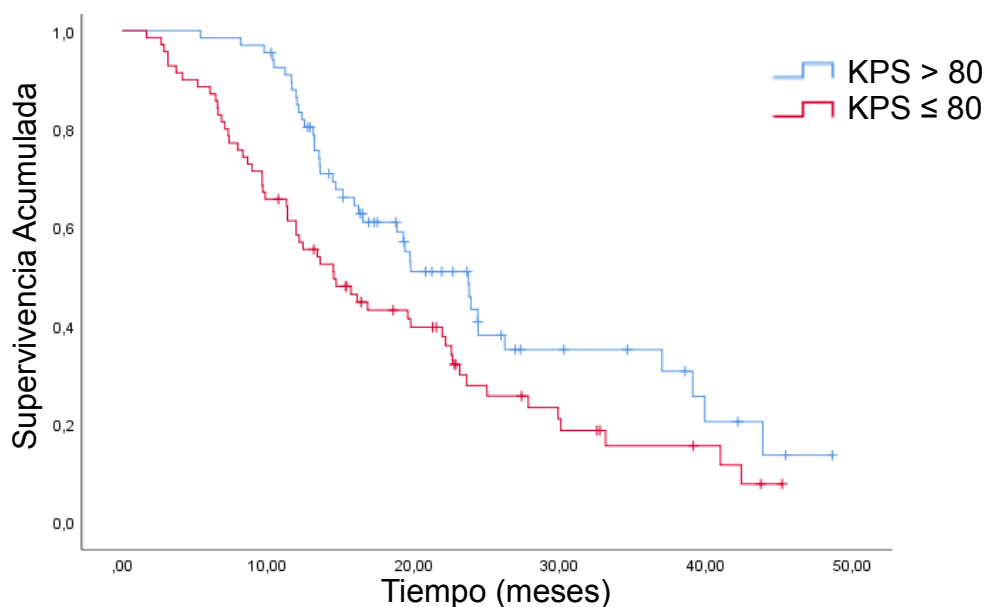


Figura 12. Comparación del tiempo de supervivencia entre pacientes SCLC con KPS ≤ 80 % y aquellos con KPS > 80%.

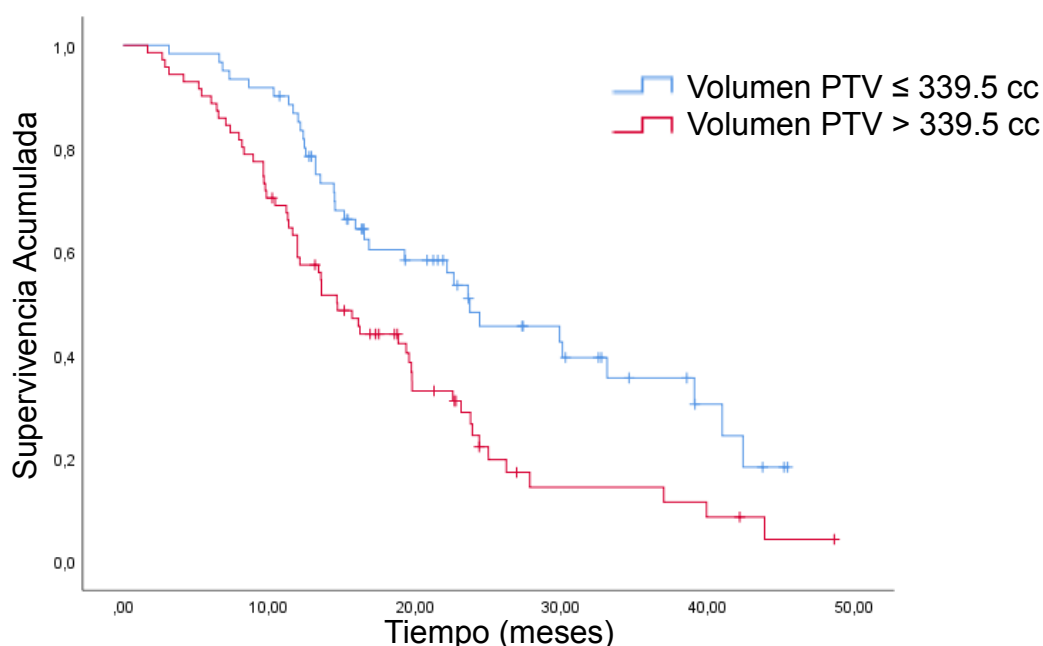


Figura 13. Comparación del tiempo de supervivencia global entre pacientes con SCLC y un PTV ≤ 339.5 cc y aquellos con un volumen de PTV > 339.5 cc.

En cuanto a los volúmenes de los órganos sanos, las dosis altas por encima de la mediana (21.6 Gy) que recibe el esófago empeoran los datos de supervivencia en ambos grupos de pacientes, NSCLC y SCLC. La mediana de SG en SCLC para el esófago que recibió dosis ≥ 21.6 Gy fue de 16.6 meses frente a los 21.6 meses de aquéllos que recibieron una menor dosis (HR= 1.05, IC 95% 1.01-1.1, $p= 0.02$, Figura 14). En los pacientes con NSCLC los datos de mediana de supervivencia son 16.1 meses para dosis mayores de la mediana, y de 23.6 meses para los pacientes en los que el esófago recibió una dosis menor a la mediana (HR= 1.02, IC 95% 1.003-1.04, $p= 0.02$, Figura 15).

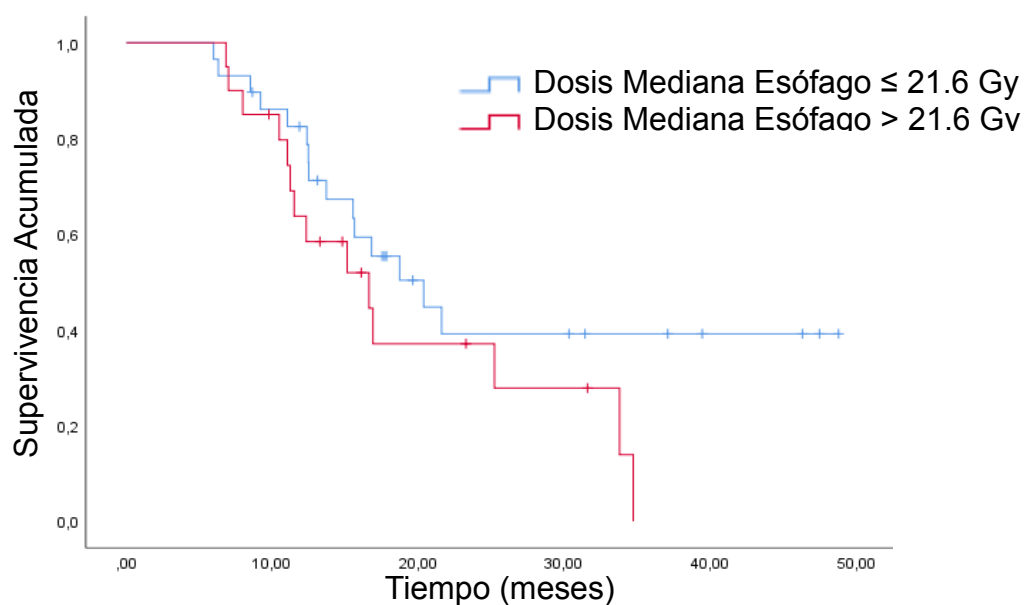


Figura 14. Comparación del tiempo de supervivencia global en pacientes SCLC entre pacientes con una dosis mediana de esófago ≤ 21.6 Gy y aquellos con una dosis >21.62 Gy.

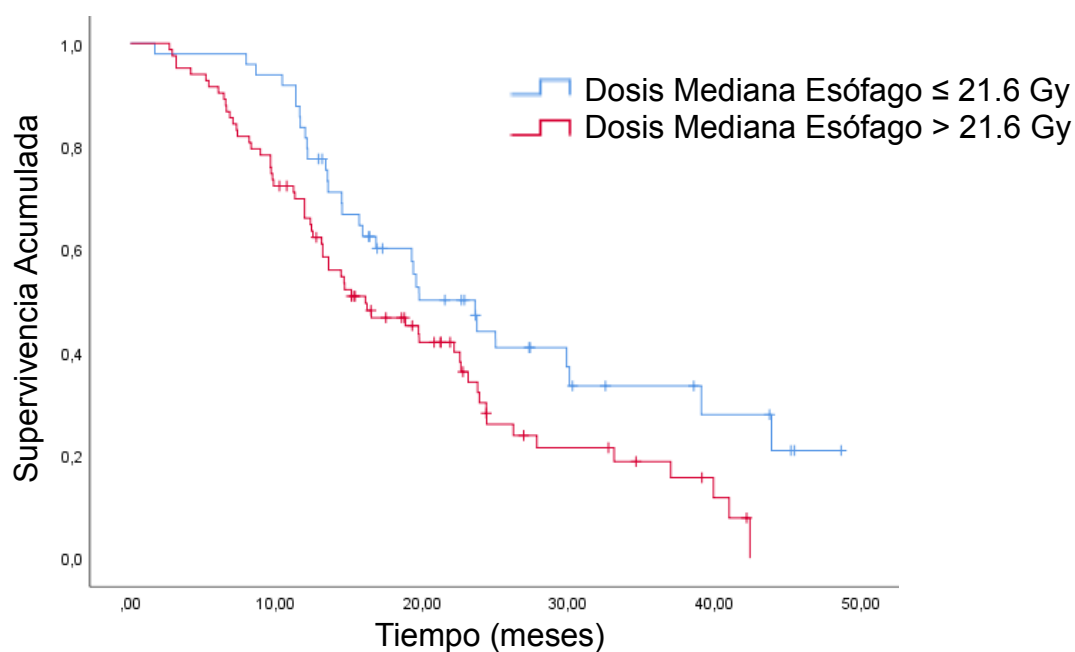


Figura 15. Comparación del tiempo de supervivencia global en pacientes NSCLC entre pacientes con una dosis mediana de esófago ≤ 21.6 Gy y aquellos con una dosis > 21.6 Gy.

Genotipos y SG

El análisis univariante demostró que el grupo de pacientes con diagnóstico de SCLC y con el genotipo CC del SNP rs7459185 del gen HSP- β 1, se asoció de manera estadísticamente significativa con una peor SG, respecto a los pacientes con genotipo GG o GC con un HR 2.53 (IC 95% 1.23-5.18, $p= 0.01$) (Tabla 15). Sin embargo, no se observaron otras asociaciones significativas entre el resto de SNP de TGF- β 1 ni HSP- β 1.

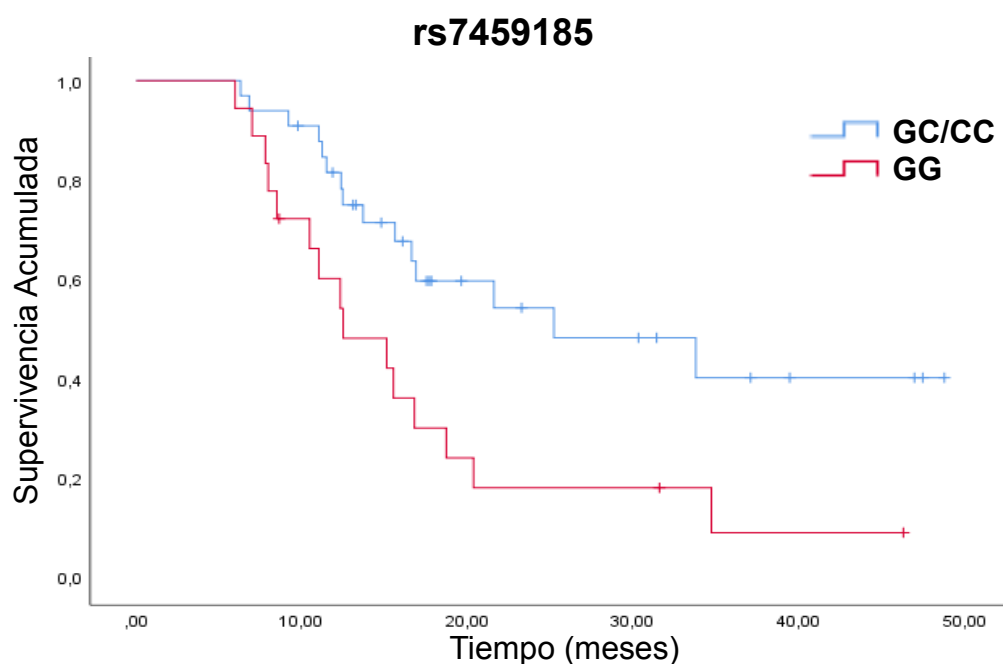


Figura 16. Comparación del tiempo de supervivencia global entre pacientes SCLC con genotipos rs7459185 heterocigótico/mutado frente wild type.

4.2.1.2. SUPERVIVENCIA LIBRE DE ENFERMEDAD.

Características clínico-patológicas y SLE.

El análisis univariante de las variables clínicas mostró que el estadio clínico y la cirugía se asociaron de manera estadísticamente significativa con la supervivencia libre de enfermedad para los pacientes diagnosticados de NSCLC. Pacientes con estadio clínico IIIB y IV presentaron peor SLE respecto a estadios más precoces con un HR de 1.82 (IC 95 % 1.21-2.74, $p=0.004$). La cirugía se asoció a una mejor SLE demostrando ser un factor “protector” ($HR<1$) para la supervivencia con un HR de 0.47 (IC 95% 0.26-0.86, $p=0.01$). Para los pacientes con SCLC sólo historia de pérdida de peso previa al tratamiento se asoció de manera estadísticamente significativa a una peor SLE con un HR de 2.31 (IC 95% 1.14-4.67, $p=0.02$). No se hallaron diferencias significativas en la SLE con el resto de variables clínico-patológicas ($p>0.05$) (Tabla 16).

SUPERVIVENCIA LIBRE DE ENFERMEDAD (N= 247)						
Histología	NSCLC			SCLC		
Parámetro	HR	IC 95%	p valor	HR	IC 95%	p valor
Género						
Mujer (ref)	1.00					
Hombre	1.02	0.57-1.84	0.94	0.86	0.36-2.08	0.74

Edad. Años						
≤65 (ref)	1.00					
>65	1.19	0.79-1.78	0.41	0.83	0.40-1.73	0.62
Estado Fumador						
Ex-Fumador/Nunca (ref)	1.00			1.00		
Activo	1.45	0.53-3.95	0.47	0.89	0.43-1.85	0.75
No. de cigarros/día						
≤30 (ref)	1.00					
>30	1.17	0.77-1.79	0.46	0.95	0.49-1.86	0.89
No. paquetes año ^a						
≤63 (ref)	1.00					
>63	0.95	0.62-1.44	0.79	1.11	0.56-2.19	0.77
Historia pérdida peso						
No (ref)	1.00					
Si	1.38	0.80-2.37	0.25	2.31	1.141-4.67	0.02
Historia de alcoholismo						
No (ref)	1.00					
Si	1.01	0.63-1.60	0.98	0.67	0.33-1.35	0.26
Historia de disfagia						
No (ref)	1.00					
Si	1.29	0.52-3.21	0.58	2.05	0.70-6	0.19
KPS	1.00					
>80 (ref)	1.05	0.70-1.57	0.83	1.27	0.66-2.46	0.47

≤80						
Estadio Clínico						
I-III A (ref)	1.00					
IIIB-IV	1.82	1.21-2.74	0.004	1.92	0.92-4.01	0.08
Cirugía						
No (ref)	1.00					
Si	0.47	0.26-0.86	0.01	0.85	0.43-1.70	0.65
Tratamiento RT, días						
≤45 (ref)	1.00					
>45	1.51	0.93-2.46	0.10	0.93	0.45-1.94	0.85
Dosis total RT. Gy						
≤60 (ref)	1.00					
>60	1.33	0.82-2.15	0.26	0.87	0.39-1.90	0.72
Fraccionamiento RT						
Una vez al día (ref)	1.00					
Dos veces al día	6.17	0.83-46.07	0.08	0.85	0.43-1.70	0.65
CRT Concomitante						
No (ref)	1.00					
Si	0.93	0.61-1.41	0.74	1.26	0.65-2.43	0.50

Tabla 16. Asociación entre características clínico-patológicas de los pacientes y la Supervivencia Libre de Enfermedad. Abreviaturas: NSCLC, non-small-cell lung carcinoma; SCLC, small-cell lung carcinoma; KPS, Karnofsky Performance Status; RT, Radioterapia; CRT, Quimio-radioterapia;

^a Número de paquetes-año = (paquetes fumados por día) x (años como fumador).

Características dosimétricas y SLE.

El análisis log Rank de las variables dosimétricas señaló como estadísticamente significativas la dosis máxima que recibe el esófago y la dosis mediana para pacientes con diagnóstico de NSCLC. Y, por otro lado, la dosis mínima de esófago y los volúmenes de PTV y de CTV para los pacientes con CP subtipo SCLC. Aquellos pacientes con NSCLC que recibieron en el esófago una dosis máxima > 60.8 Gy se asociaron a peor SLE con un HR de 1.59 (IC 95% 1-2.53, $p= 0.049$) y aquellos pacientes que recibieron una dosis mediana en el esófago alta también se asociaron a un peor control local con un HR de 1.01 (IC 95% 1-1.03, $p= 0.03$). Para los pacientes diagnosticados de SCLC y una dosis mínima de esófago elevada y los volúmenes PTV > 339.5 cc y CTV > 174.2 cc se asociaron a peor supervivencia libre de enfermedad ($p= 0.005$, $p= 0.01$ y $p= 0.001$, respectivamente). Estas asociaciones entre elevadas dosis a tejidos sanos y mal control local de la enfermedad (SLE) puede estar en relación a la toxicidad aguda que puede conllevar retrasos en la administración del tratamiento o incluso no poder recibir las dosis radicales por deterioro del paciente (Tabla 17). Del mismo modo los grandes volúmenes de tratamiento, directamente relacionados con el volumen tumoral así como del estadio de la enfermedad se asocian a una peor SLE de manera estadísticamente

significativa. En concreto volumen de PTV y CTV mayores de la mediana en pacientes con diagnóstico de SCLC, $p = 0.01$ y 0.001 respectivamente.

SUPERVIVENCIA LIBRE DE ENFERMEDAD (N= 247)						
Histología	NSCLC			SCLC		
Parámetro	HR	IC 95%	p valor	HR	IC 95%	p valor
PTV, cc ^a	1.001	1.00-1.002	0.12	1.001	1.001-1.002	0.09
PTV med	1.22	0.81-1.83	0.35	0.99	0.95-1.03	0.01
PTV D98	1.01	0.99-1.03	0.43	2.56	1.25-5.26	0.75
PTV D98 med	1.22	0.79-1.90	0.37	0.64	0.29-1.41	0.27
CTV, cc ^a	1.001	0.999-1.003	0.23	1.001	1.001-1.003	0.10
CTV med	1.45	0.9-2.34	0.12	4.14	1.85-9.27	0.001
CTV D98	1.001	0.97-1.03	0.93	0.98	0.94-1.03	0.50
CTV D98 med	0.88	0.52-1.5	0.64	0.70	0.28-1.71	0.43
GTV, cc ^a	1.001	0.997-1.003	0.86	1.001	0.994-1.01	0.80
GTV med	0.70	0.43-1.14	0.16	1.86	0.75-4.6	0.18
GTV D98	1.02	0.98-1.06	0.45	0.98	0.94-1.03	0.46
GTV D98 med	0.74	0.44-1.23	0.25	1.05	0.4-2.76	0.93
Volumen de esófago	1.01	0.99-1.03	0.26	1.001	0.96-1.03	0.85
Volumen de esófago med	1.03	0.68-1.55	0.90	0.96	0.48-1.87	0.89

D _{min} de esófago ^a	1.05	0.96-1.14	0.29	1.33	1.09-1.63	0.01
D _{min} de esófago med	1.31	0.86-1.99	0.21	1.52	0.77-3	0.23
D _{max} de esófago ^a	1.01	0.99-1.03	0.30	1.001	0.98-1.02	0.89
D _{max} de esófago med	1.59	1.001-2.53	0.049	0.59	0.27-1.31	0.2
MED ^a	1.01	0.996-1.03	0.14	1.03	0.996-1.07	0.08
MED ^a med	0.95	0.62-1.44	0.81	1.53	0.77-3.02	0.22
Dosis Mediana de esófago ^a	1.01	1.002-1.03	0.03	1.01	0.99-1.04	0.27
Dosis Mediana de esófago med ^a	1.34	0.88-2.03	0.18	1.64	0.83-3.22	0.15
V ₅ ^a	1.01	0.999-1.03	0.06	1.02	0.99-1.04	0.15
V ₅ med	1.5	0.98-2.31	0.06	1.08	0.5-2.33	0.85
V ₁₀ ^a	1.01	0.999-1.02	0.08	1.02	0.998-1.05	0.07
V ₁₀ med	1.31	0.86-2	0.21	1.44	0.69-3.01	0.33
V ₁₅ ^a	1.01	0.999-1.02	0.07	1.01	0.99-1.02	0.4
V ₁₅ med	1.22	0.8-1.86	0.35	1.57	0.78-3.18	0.21
V ₂₀ ^a	1.01	0.998-1.02	0.11	1.02	0.996-1.04	0.1
V ₂₀ med	1.24	0.82-1.88	0.32	1.83	0.91-3.67	0.09
V ₂₅ ^a	1.01	0.998-1.02	0.11	1.02	0.997-1.04	0.09
V ₂₅ med	1.25	0.82-1.91	0.29	1.92	0.96-3.85	0.07
V ₃₀ ^a	1.01	0.997-1.02	0.13	1.02	0.997-1.04	0.09
V ₃₀ med	1.001	0.66-1.52	0.99	1.92	0.96-3.85	0.07
V ₃₅ ^a	1.01	0.997-1.02	0.15	1.02	0.996-1.04	0.1
V ₃₅ med	0.92	0.61-1.39	0.7	1.6	0.8-3.2	0.18

V ₄₀ ^a	1.01	0.997-1.02	0.18	1.01	0.996-1.04	0.2
V ₄₀ med	0.81	0.54-1.22	0.31	1.61	0.81-3.2	0.18
V ₄₅ ^a	1.01	0.996-1.02	0.2	1.01	0.99-1.03	0.27
V ₄₅ med	0.9	0.59-1.35	0.58	1.74	0.88-3.48	0.11
V ₅₀ ^a	1.01	0.996-1.02	0.18	1.001	0.98-1.03	0.74
V ₅₀ med	0.99	0.65-1.5	0.94	1.42	0.71-2.83	0.32
V ₅₅ ^a	1.01	0.996-1.02	0.22	1.001	0.97-1.03	0.98
V ₅₅ med	1.24	0.81-1.91	0.32	1.12	0.55-2.28	0.76
V ₆₀ ^a	1.001	0.99-1.02	0.75	1.001	0.97-1.04	0.81
V ₆₀ med	1.37	0.9-2.09	0.15	1.44	0.71-2.92	0.31
V ₆₅ ^a	1.001	0.98-1.02	0.97	1.04	0.99-1.1	0.13
V ₆₅ med	1.21	0.78-1.84	0.37	1.91	0.95-3.84	0.07
V ₇₀ ^a	1.001	0.98-1.03	0.74	1.08	0.997-1.16	0.06
V ₇₀ med	1.1	0.73-1.68	0.63	1.7	0.85-3.4	0.14

Tabla 17. Asociación entre características dosimétricas relacionadas con el tratamiento radioterápico y la Supervivencia Libre de Enfermedad. Abreviaturas: NSCLC, non-small-cell lung carcinoma; SCLC, small-cell lung carcinoma; GTV, gross tumor volume; CTV, clinical target volume; PTV, planning target volume; MED, dosis media de esófago; Dmin de esófago, la dosis mínima de esófago; Dmax del esófago, la dosis máxima de esófago; V(x), volumen del esófago normal que recibe X Gy o más radiación; V (x) med, volumen medio del esófago normal que recibe X Gy o más radiación.

^a Los parámetros dosimétricos se analizaron como variables continuas.

Análisis Multivariante

Para el análisis multivariante se realizó el modelo de riesgos proporcionales de Cox para valorar la posible relación entre las variables clínico-patológicas-terapéuticas y biológicas y la SLE. Para el análisis multivariante se desarrolló un ajuste de las variables significativas del modelo univariante por edad, KPS, estadio clínico, pérdida de peso, volumen de PTV y dosis mínima que recibe el esófago para pacientes con diagnóstico de SCLC. Por otro lado, para pacientes NSCLC se ajustó por edad, KPS, estadio clínico, cirugía, dosis mediana que recibe el esófago.

Tras la realización del análisis de riesgos proporcionales de Cox con “paso atrás”, aún mantenían la asociación estadísticamente significativa con la pérdida de peso y la dosis mínima que recibe el esófago para pacientes con diagnóstico de SCLC ($p= 0.02$ y 0.01 , respectivamente). Las variables cirugía y la dosis mediana que recibe el esófago mantuvieron la significación estadística en pacientes NSCLC ($p= 0.01$ y 0.03 , respectivamente) (Tabla 18).

SUPERVIVENCIA LIBRE DE ENFERMEDAD (N= 247)						
Histología	NSCLC			SCLC		
Parámetro	HR	IC 95%	<i>p</i> valor	HR	IC 95%	<i>p</i> valor
Pérdida de peso				2.39	1.16-4.91	0.02

Cirugía						
No (ref)	1.00					
Si	0.45	0.24-0.84	0.01			
Dosis Mediana						
Esófago	1.01	1-1.03	0.02			
Dosis Mínima Esófago				1.382	1.11-1.73	0.01
rs11466353 (<i>TFGβ1</i>)						
AA/CA (ref)	1.00			1.00		
CC	0.995	0.53-1.87	0.99	0.6	0.14-2.49	0.48
rs7459185 (<i>HSPβ1</i>)						
GG			0.02			0.72
GC	1.79	1.14-2.79	0.01	1.23	0.57-2.66	0.6
CC	1.81	0.88-3.71	0.11	1.47	0.5-4.29	0.48
rs7459185 (<i>HSPβ1</i>)						
GC/CC (ref)	1.00			1.00		
GG	1.67	1.1-2.52	0.02	1.3	0.65-2.56	0.46

Tabla 18. Análisis multivariante utilizando un análisis de riesgos proporcionales de Cox con un procedimiento de eliminación “paso atrás” de factores asociados con la Supervivencia Libre de Enfermedad. Abreviaturas: NSCLC, non-small-cell lung carcinoma; SCLC, small-cell lung carcinoma.

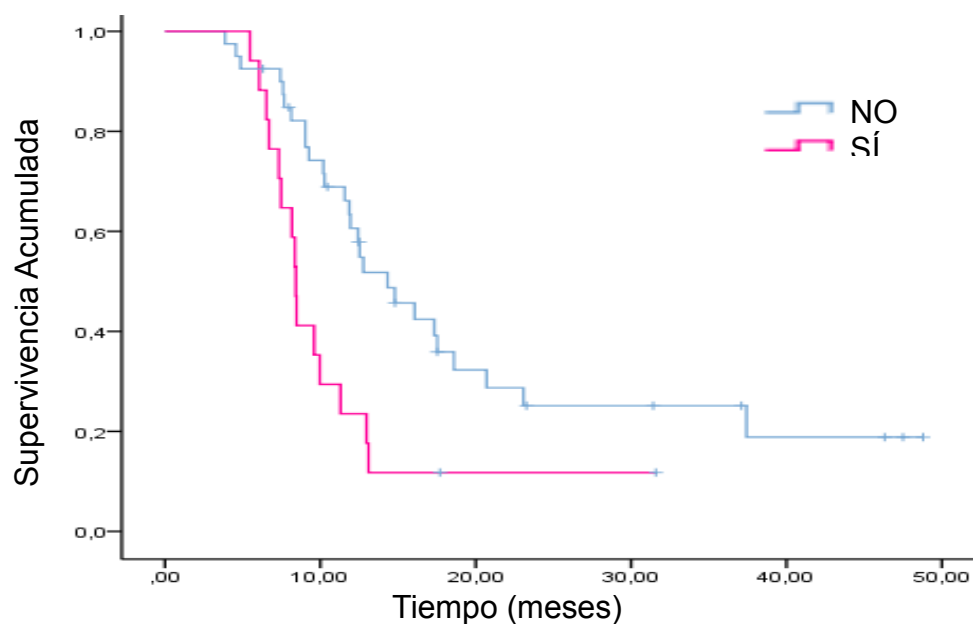


Figura 17. Comparación del tiempo de supervivencia libre de enfermedad entre pacientes SCLC que perdieron peso frente aquellos que no lo perdieron.

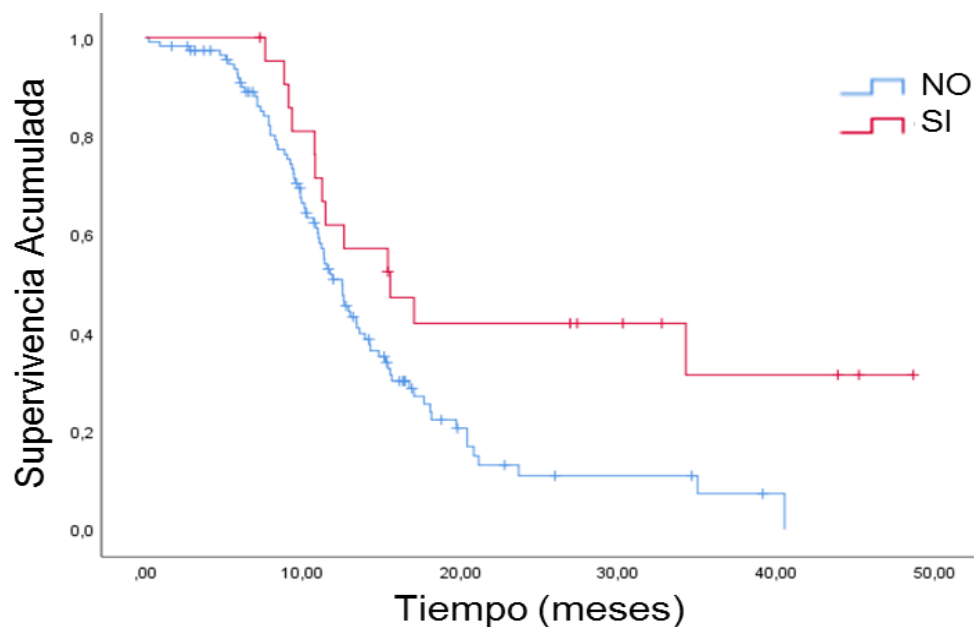


Figura 18. Comparación del tiempo de supervivencia libre de enfermedad entre pacientes NSCLC sometidos a cirugía y aquéllos que no fueron intervenidos.

Genotipos y SLE

El modelo de riesgos proporcionales de Cox se empleó para la evaluación de la asociación de las variables biológicas con la Supervivencia. Para el análisis multivariante se realizó un ajuste por cada uno de los SNPs analizados. Sólo el SNP rs7459185 se asoció a una peor SLE en pacientes diagnosticados de NSCLC, manteniéndose la asociación estadísticamente significativa después de la realización de un modelo de riesgos proporcionales de Cox con “paso atrás” con un HR de 1.67 (IC 95% 1.1-2.52, $p=0.02$) (Tabla 18). Ninguna otra asociación estadísticamente significativa entre el resto de SNPs de TGF- β 1 ni HSP- β 1 fue objetivada.

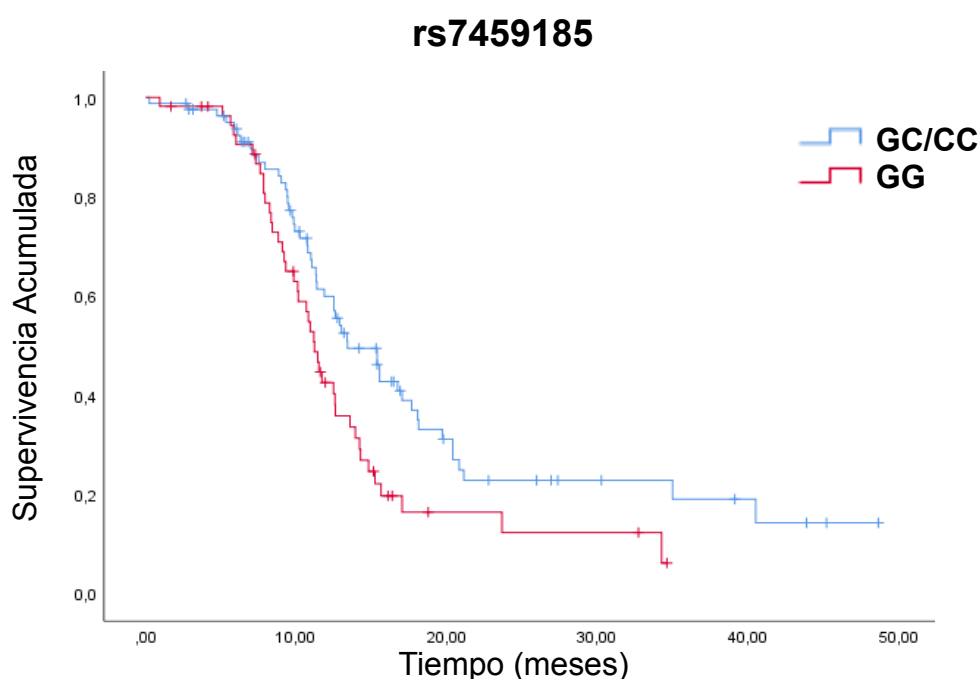


Figura 19. Comparación del tiempo de supervivencia libre de enfermedad entre pacientes NSCLC con genotipos rs7459185 heterocigótico/mutado frente a wild type.

4.3. TOXICIDAD ESOFÁGICA.

En el momento del análisis, 141 pacientes (57%) habían experimentado RIET aguda (152 eventos) y 28 pacientes (13%) RIET tardía (31 eventos). La toxicidad esofágica aguda grado 2 y 3 para todos los pacientes fue del 47% (n = 116) y 4.5% (n = 11), respectivamente, y 7.3% (n = 18) y 1.2% (n = 3) para la RIET tardía, respectivamente. No hubo ningún evento de toxicidad aguda o tardía grado 4-5. La mediana de tiempo entre el primer día de radioterapia y el desarrollo de RIET aguda de grado 2 y 3 fue de 0.7 (rango, 0.17-2.9) y 1.6 (rango, 0.5-2.03) meses, respectivamente.

Los eventos ocurridos se recogen en la tabla 19.

Grado	ESOFAGITIS AGUDA	ESOFAGITIS CRÓNICA
	No. de Pacientes (%)	No. de Pacientes (%)
	N= 247	N= 247
0	105 (42.5)	219 (88.7)
1	25 (10.1)	10 (4.1)
2	116 (47.0)	18 (7.3)
3	11 (4.5)	3 (1.2)

4	0 (0)	0 (0)
5	0 (0)	0 (0)

Tabla 19. Número de eventos de Esofagitis Rádica Aguda y Crónica según la clasificación CTCAE v4.03.

4.3.1 CORRELACIÓN ENTRE TOXICIDAD ESOFÁGICA Y LOS SNPs

SELECCIONADOS.

El análisis univariante para identificar las posibles asociaciones entre las características del paciente, el tumor, el tratamiento y la esofagitis aguda y tardía asociada a la radioterapia se muestran en la Tabla 20 y 21 respectivamente.

En relación a las características de los pacientes, la edad, el tabaquismo y la historia previa de pérdida de peso se asociaron con RIET aguda grado 2 en el análisis univariante (Tabla 20).

El PTV y el GTV también se asociaron significativamente con la esofagitis aguda grado 2 ($p < 0.05$), mientras que el CTV se asoció a la esofagitis aguda de ambos grados (2 y 3). La media y mediana de la dosis de esófago y los parámetros dosimétricos del volumen de esófago (en porcentaje) expuestos

desde 5 Gy (V5) hasta 55 Gy (V55), también se asociaron con el riesgo de RIET aguda grado 2 en el análisis univariante.

Con respecto al tipo de tratamiento recibido, el hiperfraccionamiento de la RT (2 veces al día) y la radioquimioterapia concurrente se asociaron con mayores tasas de esofagitis aguda grado 2. En cuanto al daño esofágico tardío, el tiempo medio para el desarrollo de eventos después de la finalización de la RT fue de 9 meses (3-18 meses). La dosis de irradiación y el fraccionamiento se correlacionaron con el desarrollo de RIET tardía grado 2 (Tabla 21).

En cuanto al SNP seleccionado para la validación, no se halló ninguna asociación estadísticamente significativa entre el genotipo rs2868371 CC y un mayor riesgo de esofagitis aguda o tardía (esofagitis aguda grado 2, $p= 0.76$; grado 3 de esofagitis aguda, $p= 0.49$; grado de esofagitis tardía 1, $p= 0.34$; esofagitis tardía grado 2, $p= 0.38$). De igual manera, los genotipos AG / AA rs1800469 previamente asociados con un mayor riesgo de RIET no fueron estadísticamente significativos en nuestra población analizada (esofagitis aguda grado 2, $p= 0.74$; grado 3 de esofagitis aguda, $p= 0.85$; grado 1 de esofagitis tardía, $p= 0.35$; grado 2 de esofagitis tardía, $p= 0.56$). Al igual que estudios previos publicados, rs2868370 no mostró asociación con RIET (esofagitis aguda grado 2, $p= 0.87$; grado 3 de esofagitis aguda, $p= 0.53$, grado 1 de esofagitis tardía, $p= 0.78$; grado 2 de esofagitis tardía, $p= 0.19$).

Para el resto de los SNP estudiados, el análisis univariante de riesgos proporcionales de Cox mostraron que los pacientes portadores del genotipo rs7459185 CC estaban asociados con un mayor riesgo de desarrollar RIET

aguda grado 3 (HR = 5.08; IC 95% = 1.35-19.15; $p = 0.02$, Tabla 20; Figura 20). Este efecto se mantuvo en el análisis multivariante, lo que sugiere que una asociación independiente entre la incidencia de esofagitis aguda grado 3 y el genotipo CC del SNP rs7459185 (Tabla 22). Los pacientes que presentaban el genotipo rs7459185 CC tenían una tasa de esofagitis rádica aguda grado 3 del 17% (3/18) en comparación con el 4% (8/229) de aquellos pacientes con el genotipo rs7459185 GG / GC.

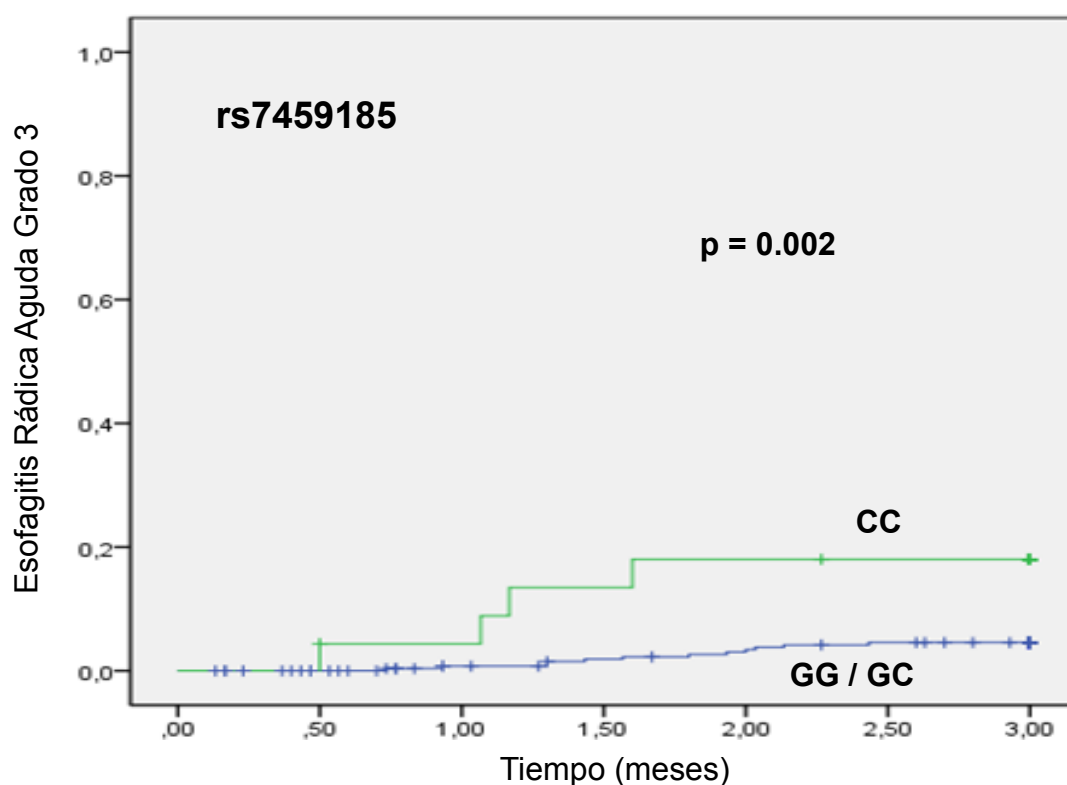


Figura 20. Curva de Kaplan-Meier para esofagitis aguda inducida por radiación grado 3 en pacientes con cáncer de pulmón portadores de diferentes genotipos del SNP rs7459185.

Los pacientes portadores del genotipo GG del SNP rs11466353 estaban asociados con un menor riesgo de desarrollar RIET grado 2 tardía (HR= 0.33; IC 95% 0.12-0.91; p= 0.03; Tabla 21). Este efecto se mantuvo en el análisis multivariante (HR= 0.29; IC 95% 0.1-0.83; p= 0.02, Tabla 22; Figura 21).

Los pacientes portadores de los genotipos TT / TG del SNP rs11466353 presentan una tasa RIET tardía grado 2 del 23% (5/21) en comparación con el 7% (13/182) de aquellos pacientes que poseen un genotipo rs11466353 GG.

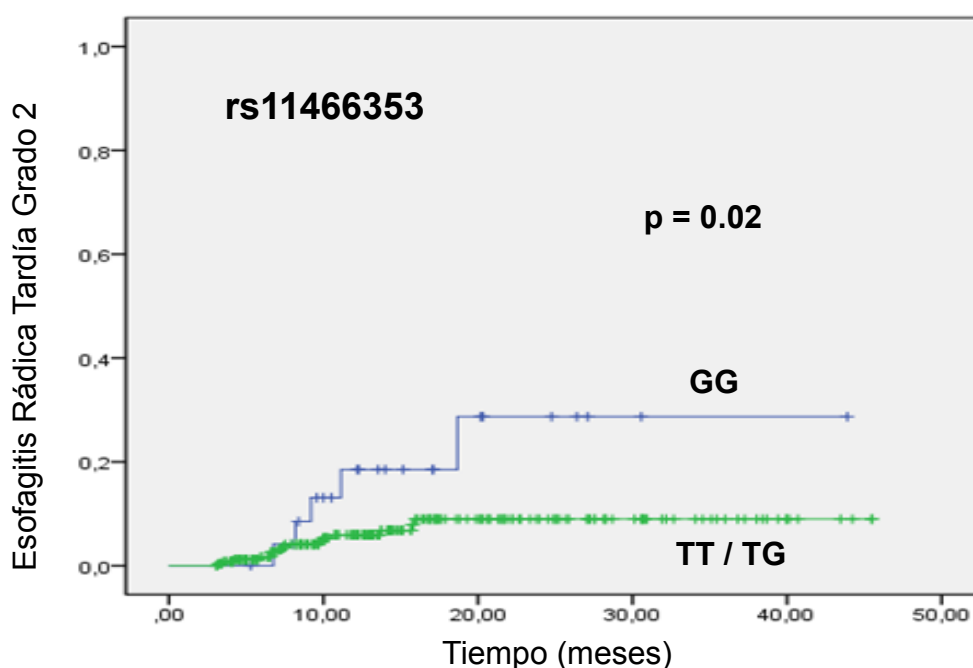


Figura 21. Curva de Kaplan-Meier para esofagitis tardía inducida por radiación grado 2 en pacientes con cáncer de pulmón portadores de diferentes genotipos del SNP rs11466353.

Es bien conocido que la dosis recibida por el esófago es uno de los principales factores que condiciona la toxicidad rádica. Con el fin de conocer el impacto de los SNPs estudiados, se realizaron análisis que combinaban ambos factores: los SNPs y las dosis en esófago. La Figura 22 muestra los eventos de RIET aguda grado 3 en función del tiempo teniendo en cuenta el SNP rs7459185 y el valor dosimétrico V30. Los pacientes con altos valores del V30 (cifras mayores que la mediana) y los genotipos rs7459185 GG / GC tuvieron una incidencia de RIET aguda grado 3 significativamente menor ($p < 0.001$) en comparación con los pacientes portadores del genotipo CC.

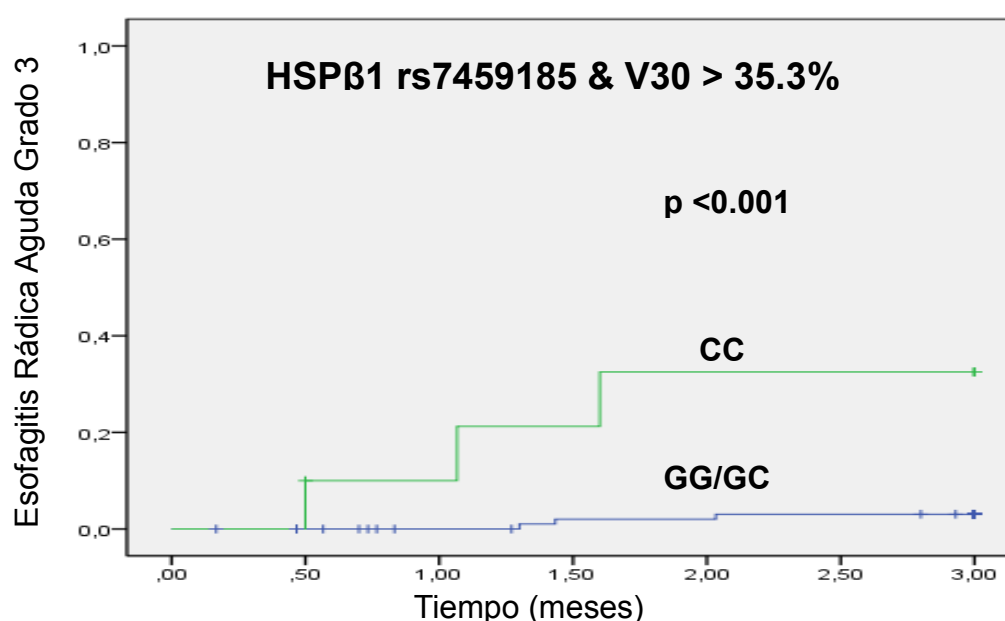


Figura 22. Curva de Kaplan-Meier para el efecto de los genotipos rs7459185 en pacientes con cáncer de pulmón que reciben V30 alta (> mediana) en la incidencia acumulada de esofagitis aguda inducida por radiación grado 3.

La Figura 23 muestra los eventos de RIET crónica grado 2 en función del tiempo de acuerdo con el SNP rs11466353 y la dosis de RT administrada. Los pacientes que recibieron dosis de radiación más altas (> 60 Gy) y el genotipo rs11466353 GG tuvieron una incidencia de RIET crónica grado 2 significativamente menor ($p = 0.03$) en comparación con los pacientes que portaban los genotipos TT / TG.

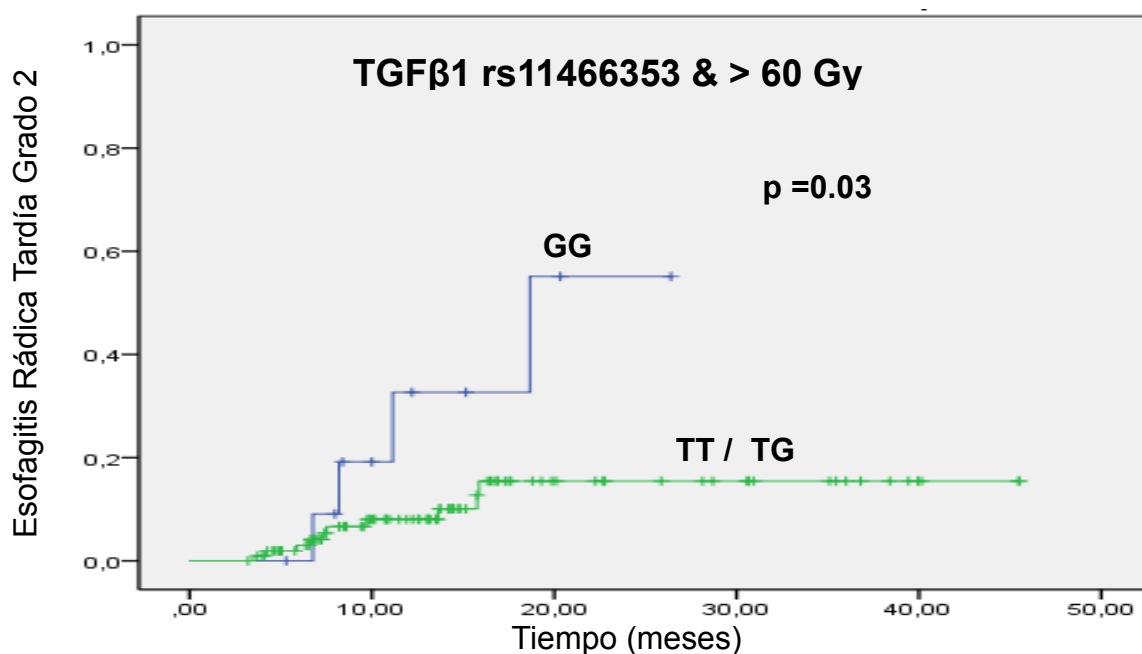


Figura 23. Curva de Kaplan-Meier para el efecto de los genotipos rs11466353 en pacientes con cáncer de pulmón que reciben dosis de radiación altas ($>$ mediana) en la incidencia acumulativa de esofagitis inducida por radiación grado 2 tardía.

No se encontró ninguna otra asociación estadísticamente significativa ($p > 0.05$) para el resto de los SNPs analizados vinculados al desarrollo de riesgo de RIET aguda o crónica.

A continuación se presenta el análisis univariante realizado entre las características relacionadas con el paciente, el tumor y el tratamiento y la toxicidad esofágica aguda y crónica secundaria a la radioterapia.

	ESOFAGITIS AGUDA (N=247)					
VARIABLE	Grado 2			Grado 3		
	HR	IC 95%	p valor	HR	IC 95%	p valor
Género						
Mujer (ref)	1.00			1.00		
Hombre	0.79	0.48-1.29	0.34	1.74	0.22-13.62	0.6
Edad, años						
≤65 (ref)	1.00			1.00		
>65	0.47	0.32-0.7	<0.001	0.66	0.19-2.25	0.51
Tratamiento						
Tumor Primario (ref)	1.00			1.00		
Recidiva	0.62	0.29-1.34	0.22	0.04	0-85.13	0.53

Hábito tabáquico						
Exfumador/Nunca (ref)	1.00			1.00		
Actual	1.56	1.08-2.26	0.02	2.54	0.68-9.58	0.17
No. de cigarros al día						
≤30 (ref)	1.00			1.00		
>30	1.09	0.75-1.58	0.64	0.67	0.19-2.38	0.54
No. de paquetes al año ^a						
≤63 (ref)	1.00			1.00		
>63	1.001	0.69-1.46	0.99	1.08	0.30-3.81	0.91
Historia de alcoholismo						
No (ref)	1.00			1.00		
Sí	1.21	0.80-1.82	0.37	0.02	0-20.86	0.28
Historia de disfagia						
No (ref)	1.00			1.00		
Sí	1.50	0.70-3.22	0.30	2.25	0.29 -17.76	0.44
Historia de pérdida peso						
No (ref)	1.00			1.00		
Sí	0.60	0.36-0.99	0.045	3.24	0.99-10.63	0.05
KPS						
>80 (ref)	1.00			1.00		
≤80	0.73	0.50-1.04	0.08	0.83	0.25-2.73	0.76
Peso previo a RT, Kg	1.00			1.00		
≤75 (ref)	0.89	0.60-1.32	0.57	1.71	0.36-8.06	0.5

>75						
Histología						
SCLC (ref)	1.00			1.00		
NSCLC	0.67	0.44-1.01	0.05	0.85	0.23-3.21	0.81
Estadio Clínico						
I-II (ref)	1.00			1.00		
III-IV	2.09	0.97-4.5	0.06	24.12	0.01-86197	0.45
Surgery						
No (ref)	1.00			1.00		
Yes	0.73	0.42-1.25	0.25	0.04	0-35.33	0.35
Tratamiento de RT, días						
≤45 (ref)	1.00			1.00		
>45	0.87	0.6-1.25	0.43	0.46	0.14-1.58	0.22
Dosis Total RT, Gy						
≤60 (ref)	1.00			1.00		
>60	1.03	0.71-1.48	0.89	0.52	0.15-1.79	0.3
Fraccionamiento RT						
Una vez al día (ref)	1.00			1.00		
Dos veces al día	3.66	2.14-6.25	<0.001	0.04	0-593.39	0.52
CRT concomitante						
No (ref)	1.00			1.00		
Sí	1.75	1.21-2.53	0.003	3.29	0.87-12.39	0.08

PTV, cc ^b	1.001	1,00001- 1.001	0.045	1.001	0.99-1.003	0.2
CTV, cc ^b	1.001	1,0001- 1.002	0.03	1.003	1.000008; 1.005	0.049
GTV, cc ^b	1.002	1,0003- 1.004	0.02	1.003	0.99-1.01	0.32
Volumen de esófago ^b	0.98	0.97-1	0.06	1.026	0.98-1.07	0.27
D _{min} de esófago ^b	1.05	0.98-1.12	0.16	1.057	0.83-1.34	0.65
D _{max} de esófago ^b	1.02	1.004- 1.03	0.01	1.022	0.97-1.08	0.4
MED ^b	1.03	1.01-1.05	<0.001	1.05	0.99-1.11	0.08
Dosis Mediana de esófago ^b	1.02	1.01-1.03	0.002	1.026	0.99-1.06	0.131
V ₅ ^b	1.02	1.01-1.03	0.001	1.02	0.98-1.06	0.29
V ₁₀ ^b	1.02	1.01-1.03	0.001	1.02	0.99-1.06	0.22
V ₁₅ ^b	1.02	1.01-1.03	<0.001	1.02	0.99-1.06	0.16
V ₂₀ ^b	1.02	1.01-1.03	<0.001	1.03	0.997-1.07	0.08
V ₂₅ ^b	1.02	1.01-1.03	<0.001	1.03	0.996-1.07	0.08
V ₃₀ ^b	1.02	1.01-1.03	<0.001	1.03	0.998-1.07	0.06
V ₃₅ ^b	1.02	1.01-1.03	<0.001	1.03	0.99-1.07	0.1
V ₄₀ ^b	1.02	1.01-1.03	<0.001	1.03	0.99-1.06	0.13
V ₄₅ ^b	1.02	1.01-1.02	0.003	1.03	0.99-1.06	0.13

V_{50}^b	1.01	1.002- 1.02	0.02	1.03	0.995-1.06	0.1
V_{55}^b	1.01	1.0002- 1.02	0.045	1.03	0.999-1.06	0.06
V_{60}^b	1.01	0.996- 1.02	0.177	1.03	0.996-1.06	0.08
V_{65}^b	1.02	0.99-1.03	0.31	1.00	0.94-1.06	0.99
V_{70}^b	0.99	0.97-1.02	0.6	1.03	0.97-1.08	0.36
rs11466353						
TT/TG (ref)	1.00			1.00		
GG	1.04	0.56-1.94	0.89	0.47	0.1-2.17	0.33
rs7459185						
GG/GC (ref)	1.00			1.00		
CC	1.37	0.71-2.61	0.35	5.08	1.35-19.15	0.02
rs2868371						
CC (ref)	1.00			1.00		
CG/GG	1.06	0.73-1.54	0.76	1.47	0.49-4.37	0.49
rs1800469						
AA (ref)	1.00			1.00		
AG/GG	0.93	0.61-1.43	0.74	0.89	0.27-2.92	0.85
rs1800468						
CC (ref)	1.00			1.00		
CT/TT	1.03	0.61-1.74	0.90	1.58	0.34-7.33	0.56

rs11466343						
CC (ref)	1.00			1.00		
CT/TT	1.01	0.44-2.29	0.98	2.29	0.29-18.3	0.44
rs2868370						
GG (ref)	1.00			1.00		
GA/AA	0.96	0.54-1.69	0.87	1.89	0.27-13.4	0.53

Abreviaturas: KPS, Karnofsky Performance Status; NSCLC, carcinoma de pulmón de célula no pequeña; SCLC, carcinoma de pulmón de célula pequeña; RT, Radioterapia; CRT, Quimio-Radioterapia; GTV, gross tumor volumen; CTV, clinical target volumen; PTV, planning target volumen; MED, dosis media de esófago; Dmin de esófago, la dosis mínima que recibe el esófago; Dmax de esófago, la dosis máxima que recibe el esófago; V (x), volumen de esófago normal que recibe X Gy o más radiación.

^a Número de paquetes de años = (paquetes fumados por día) x (años como fumador).

^b Los parámetros dosimétricos se analizaron como variables continuas.

Tabla 20. Asociaciones entre las características relacionadas con el paciente, el tumor y el tratamiento y la toxicidad esofágica aguda por radioterapia.

	ESOFAGITIS CRÓNICA (N=216)					
VARIABLE	Grado 1			Grado 2		
	HR	IC 95%	p valor	HR	IC 95%	p valor
Género						
Mujer (ref)	1.00			1.00		
Hombre	0.69	0.15-3.24	0.64	3.00	0.40-22.52	0.29
Edad, años						
≤65 (ref)	1.00			1.00		
>65	1.22	0.35-4.21	0.76	0.77	0.30-1.98	0.59
Tratamiento						
Tumor Primario (ref)	1.00			1.00		
Recidiva	0.04	0-2254.28	0.57	0.49	0.06-3.67	0.49
Hábito tabáquico						
Exfumador/Nunca (ref)	1.00			1.00		
Actual	0.94	0.27-3.26	0.93	0.92	0.37-2.32	0.86
No. de cigarros al día						
≤30 (ref)	1.00			1.00		
>30	0.49	0.12-1.98	0.32	1.51	0.57-4.03	0.41
No. de paquetes al año ^a						
≤63 (ref)	1.00			1.00		
>63	0.59	0.16-2.18	0.43	1.56	0.75-3.26	0.23
Historia de alcoholismo	1.00	0.17-6.67	0.91	1.00	0.61-5.37	0.29

No (ref)	1.11			1.80		
Sí						
Historia de disfagia						
No (ref)	1.00			1.00		
Sí	2.46	0.31-19.43	0.39	1.56	0.21-11.81	0.67
Historia de pérdida peso						
No (ref)	1.00			1.00		
Sí	1.03	0.22-4.88	0.97	1.68	0.60-4.74	0.33
KPS						
>80 (ref)	1.00			1.00		
≤80	2.84	0.74-11	0.13	0.74	0.29-1.91	0.53
Peso previo a RT, Kg						
≤75 (ref)	1.00			1.00		
>75	0.56	0.16-2	0.38	6.32	0.84-47.71	0.07
Histología						
SCLC (ref)	1.00			1.00		
NSCLC	1.14	0.24-5.51	0.87	1.37	0.39-4.8	0.63
Estadio Clínico						
I-II (ref)	1.00			1.00		
III-IV	1.32	0.17-10.45	0.79	2.64	0.35-19.83	0.35
Surgery						
No (ref)	1.00			1.00		
Yes	0.46	0.06-3.64	0.462	0.48	0.11-2.11	0.34

Tratamiento de RT, días						
≤45 (ref)	1.00			1.00		
>45	0.33	0.09-1.29	0.11	2.15	0.77-6.03	0.15
Dosis Total RT, Gy						
≤60 (ref)	1.00			1.00		
>60	0.55	0.16-1.95	0.36	3.05	1.01-9.28	0.049
Fraccionamiento RT						
Una vez al día (ref)	1.00			1.00		
Dos veces al día	1.10	0.14-8.69	0.93	1.26	0.29-5.48	0.76
CRT concomitante						
No (ref)	1.00			1.00		
Sí	1.58	0.44-5.58	0.48	1.35	0.53-3.42	0.53
PTV, cc ^b	1.00	0.998-1.003	0.82	1.001	0.99-1.003	0.2
CTV, cc ^b	1.00	0.99-1.004	0.51	1.001	0.99-1.004	0.56
GTV, cc ^b	1.003	0.997-1.01	0.33	1.00	0.99-1.01	0.96
Volumen de esófago ^b	1.01	0.97-1.06	0.6	1.01	0.97-1.05	0.72
D _{min} de esófago ^b	0.84	0.41-1.73	0.63	1.11	0.97-1.27	0.12
D _{max} de esófago ^b	0.99	0.96-1.03	0.64	1.01	0.98-1.05	0.42
MED ^b	1.003	0.95-1.06	0.93	1.04	0.997-1.08	0.07
Dosis Mediana de esófago ^b	1.02	0.98-1.05	0.35	1.01	0.98-1.04	0.52
V ₅ ^b	1.01	0.97-1.05	0.61	1.03	0.999-1.06	0.06

V ₁₀ ^b	1.01	0.98-1.05	0.54	1.02	0.99-1.05	0.13
V ₁₅ ^b	1.01	0.98-1.04	0.64	1.01	0.99-1.04	0.29
V ₂₀ ^b	1.003	0.97-1.04	0.82	1.02	0.995-1.05	0.11
V ₂₅ ^b	1.003	0.97-1.04	0.85	1.02	0.99-1.04	0.18
V ₃₀ ^b	1.003	0.97-1.04	0.85	1.02	0.99-1.04	0.16
V ₃₅ ^b	1.004	0.97-1.04	0.79	1.02	0.995-1.05	0.11
V ₄₀ ^b	1.004	0.97-1.04	0.79	1.02	0.99-1.04	0.13
V ₄₅ ^b	1.004	0.97-1.04	0.82	1.01	0.99-1.04	0.28
V ₅₀ ^b	1.003	0.97-1.04	0.86	1.02	0.99-1.04	0.24
V ₅₅ ^b	0.994	0.96-1.04	0.78	1.02	0.995-1.05	0.14
V ₆₀ ^b	0.995	0.95-1.04	0.81	1.02	0.997-1.05	0.09
V ₆₅ ^b	0.96	0.87-1.05	0.36	1.02	0.98-1.05	0.39
V ₇₀ ^b	0.971	0.86-1.01	0.64	0.99	0.92-1.06	0.78
rs11466353						
TT/TG (ref)	1.00			1.00		
GG	0.49	0.1-2.28	0.36	0.33	0.12-0.91	0.03
rs7459185						
GG/GC (ref)	1.00			1.00		
CC	1.19	0.15-9.44	0.87	0.61	0.08-4.62	0.64
rs2868371						
CC (ref)	1.00			1.00		
CG/GG	1.73	0.56-5.29	0.34	0.64	0.23-1.75	0.38

rs1800469						
AA (ref)	1.00			1.00		
AG/GG	2.21	0.43-11.43	0.35	0.67	0.18-2.51	0.56
rs1800468						
CC (ref)	1.00			1.00		
CT/TT	3.05	0.59-15.72	0.18	1.72	0.58-5.1	0.33
rs11466343						
CC (ref)	1.00			1.00		
CT/TT	6.28	0.65-60.41	0.11	0.05	0-293.97	0.49
rs2868370						
GG (ref)	1.00			1.00		
GA/AA	1.50	0.09-24.18	0.78	3.11	0.57-17.02	0.19

Abreviaturas: KPS, Karnofsky Performance Status; NSCLC, carcinoma de pulmón de célula no pequeña; SCLC, carcinoma de pulmón de célula pequeña; RT, Radioterapia; CRT, Químio-Radioterapia; GTV, gross tumor volumen; CTV, clinical target volumen; PTV, planning target volumen; MED, dosis media de esófago; Dmin de esófago, la dosis mínima que recibe el esófago; Dmax de esófago, la dosis máxima que recibe el esófago; V (x), volumen de esófago normal que recibe X Gy o más radiación.

^a Número de paquetes de años = (paquetes fumados por día) x (años como fumador).

^b Los parámetros dosimétricos se analizaron como variables continuas.

Tabla 21. Asociaciones entre las características relacionadas con el paciente, el tumor y el tratamiento y la toxicidad esofágica crónica por radioterapia.

Las siguientes tablas corresponden al análisis multivariante realizado mediante el método riesgos proporcionales de Cox y con un procedimiento de eliminación progresiva “paso atrás” de los factores asociados con la esofagitis aguda y tardía.

VARIABLE	ESOFAGITIS AGUDA (N=247)					
	Grado 2			Grado 3		
	HR	IC 95%	<i>p</i> valor	HR	IC 95%	<i>p</i> valor
Edad, años						
≤65 (ref)	1.00					
>65	0.63	0.4-1.01	0.05			
KPS						
≤80 (ref)				1.00	1.61-	
>80				21.43	286.12	0.02
rs11466353						
AA/CA (ref)						
CC						
rs7459185						
GG/GC (ref)				1.00		
CC				17.73	2.9-108.49	0.002
Dosis Total RT, Gy						

≤60 (ref)						
>60						
Fraccionamiento						
RT						
Una vez al día						
(ref)	1.00					
Dos veces al día	2.85	1.6-5.07	<0.001			
V ₂₀ ^a	1.02	1.02-1.01	0.003			
V ₃₀ ^a				1.04	0.99-1.09	0.1

Abreviaturas: KPS, Karnofsky Performance Status; RT, Radioterapia; V (x), volumen de esófago normal que recibe X Gy o más radiación.

^a Los parámetros dosimétricos se analizaron como variables continuas.

Tabla 22. Análisis multivariante utilizando un análisis de riesgos proporcionales de Cox con un procedimiento de eliminación progresiva “paso atrás” de los factores asociados con la Esofagitis Aguda.

VARIABLE	ESOFAGITIS CRÓNICA (N=216)		
	<i>Grado 2</i>		
	HR	IC 95%	p valor
Edad, años			
≤65 (ref)			
>65			
KPS			
≤80 (ref)			
>80			

rs11466353 AA/CA (ref) CC	1.00 0.29	0.1-0.83	0.02
rs7459185 GG/GC (ref) CC			
Dosis Total RT, Gy ≤60 (ref) >60	1.00 2.90	0.95-8.92	0.06
Fraccionamiento RT Una vez al día (ref) Dos veces al día			
V ₂₀ ^a			
V ₃₀ ^a			

Abreviaturas: KPS, Karnofsky Performance Status; RT, Radioterapia; V (x), volumen de esófago normal que recibe X Gy o más radiación.

^a Los parámetros dosimétricos se analizaron como variables continuas.

Tabla 23. Análisis multivariante utilizando un análisis de riesgos proporcionales de Cox con un procedimiento de eliminación progresiva “paso atrás” de los factores asociados con la Esofagitis Crónica.

D

ISCUSIÓN

El cáncer de pulmón es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en todo el mundo. Los pacientes con estadios iniciales de CP son candidatos a tratamiento quirúrgico o radioterapia estereotáctica corporal (SBRT), mientras que en pacientes con estadios más avanzados requieren un abordaje multidisciplinar que incluye la combinación de radioterapia y quimioterapia (140, 141). A pesar de la intensificación en el tratamiento, es frecuente que pacientes de CP con similares características clínicas y patológicas desarrollen respuestas muy diferentes a un mismo esquema de tratamiento. Se cree que esta variación individual en la respuesta tumoral puede estar causada por factores intrínsecos del propio paciente, probablemente por la heterogeneidad en la expresión génica.

Un razonamiento posible de este hecho puede ser la variación en las funciones de diferentes proteínas justificado por la existencia de polimorfismos de nucleótido simple (SNP) en las regiones codificantes de los genes o en áreas promotoras con capacidad para modificar la transcripción génica.

Aunque distintos factores como la edad, el estado funcional del paciente, las comorbilidades existentes, el tipo de tratamiento, etc. pueden ser responsables de las diferencias en supervivencia, las diferencias biológicas también contribuyen a la variabilidad en términos de mortalidad de estos pacientes.

Hasta ahora, pocos estudios han abordado la asociación entre diferentes SNPs de genes como TGF- β 1 y HSP- β 1 y la supervivencia global en pacientes con CP. Aunque dos estudios anteriores han estado interesados en esta cuestión, los resultados de ambos estudios aportan resultados inconsistentes (142, 143).

En el presente estudio investigamos si la variabilidad individual en varios SNPs de los genes TGF- β 1 y HSP- β 1 están asociados con dos variables importantes en pacientes con CP: supervivencia y toxicidad. Se analizó, por tanto, la supervivencia global y supervivencia libre de enfermedad y, por otro lado, la toxicidad esofágica tanto aguda como crónica, en una cohorte prospectiva de 247 pacientes diagnosticados de CP y que han sido tratados con tratamiento combinado de radio(quimio)terapia.

Varios SNPs del gen HSP- β 1 se han asociado anteriormente con el riesgo de cáncer y la supervivencia. Sin embargo, esta asociación ha sido descrita en pacientes de etnias diferentes a la de nuestro estudio y con carácter retrospectivo, con notables diferencias en las distribuciones de los genotipos (144, 145).

Estudios recientes han mostrado una sobreexpresión de HSP aberrante en varios tipos de cáncer como por ejemplo el cáncer de mama (146), hepatocarcinoma (147, 148) y el cáncer de próstata (149, 150). Y, además, esta expresión de HSP- β 1 se ha asociado con una peor supervivencia en varias localizaciones tumorales (151, 152), incluyendo cáncer de estómago (153), sarcomas óseos (154), cáncer de próstata (155, 156) y el carcinoma

hepático (147). Sin embargo, el valor pronóstico de HSP- β 1 en NSCLC y SCLC no ha sido tan ampliamente estudiado.

Del mismo modo, HSP se ha implicado en la progresión de la enfermedad debido a su participación en la diferenciación de la célula tumoral, la proliferación celular, el desarrollo de metástasis y la invasión celular (151). El HSP- β 1 fosforilado es esencial en la progresión tumoral. El estudio de Katsogiannou et al. señaló que HSP- β 1 fosforilado inhibe la apoptosis, facilita la microinvasión y favorece la supervivencia de las células tumorales (157).

La investigación de Zhang et al. demostró que la expresión de la proteína HSP- β 1 estaba incrementada en el tejido pulmonar del ratón con cáncer de pulmón y predijo la relación entre la expresión de HSP- β 1 y la progresión del cáncer de pulmón (158). En la misma línea de investigación, Huang et al. indicaron que HSP- β 1 es un predictor pronóstico en pacientes con NSCLC, y se consideraría funcionalmente como un oncogén durante la progresión del NSCLC. Los pacientes con NSCLC que tenían una alta expresión de HSP- β 1 presentaron una peor supervivencia global (159).

El estudio in vivo de Zhang et al. sobre el desarrollo del cáncer de pulmón en ratones, demostró que HSP- β 1 induce la proliferación de células de cáncer de pulmón a través de la vía de activación de la proteína activadora-1 (AP-1) (158). Además, HSP- β 1 también desempeña un papel crítico en el desarrollo de resistencia al tratamiento quimioterápico en el cáncer de próstata (150) y el cáncer de colon (160), y esto puede ser debido a la fosforilación de la proteína

HSP- β 1. Cabe destacar que el inhibidor de HSP- β 1, OGX-427, se ha utilizado como un candidato farmacológico para el tratamiento de los pacientes con cáncer de próstata resistente a la castración y otros tumores en estadios avanzados (161).

Tras el análisis de todos los SNPs de ambos genes, el genotipo GG del SNP rs7459185 del gen HSP- β 1 se asoció de manera estadísticamente significativa con una peor supervivencia global en pacientes con diagnóstico de SCLC, con un HR de 2.527 ($p= 0.011$). Además, el mismo genotipo rs7459185 GG demostró un detrimento en la supervivencia libre de enfermedad en pacientes NSCLC ($p= 0.016$).

Como se ha expuesto previamente, es importante la participación de HSP- β 1 en la progresión de varios tumores y, por ello, podría ser una potencial diana terapéutica en tumores de pulmón.

Más de la mitad de todos los pacientes con CP se tratan actualmente con RT; sin embargo, el tratamiento a veces se ve gravemente limitado por la necesidad de ajustar la dosis que llega a los tejidos normales circundantes para preservar su función. La toxicidad esofágica causada por RT comprende una toxicidad real y potencialmente debilitante, causada por factores relacionados, principalmente, con el paciente.

Una limitación que preveíamos en nuestro estudio era la población de estudio, que se trataría de una única ubicación geográfica. Ya se sabe que la

distribución de los SNP varía entre los diferentes grupos étnicos o raciales. Por ello se planteó como un segundo objetivo principal la Validación Prospectiva del Riesgo de Esofagitis en nuestro medio de los estudios retrospectivos realizados recientemente por grupos internacionales en poblaciones asiáticas de Guo et al. (134) y norteamericanas de Xu et al. (135).

En el presente estudio, la mitad de los pacientes presentaron esofagitis aguda grado 2 o 3, lo que supone una complicación que puede requerir tratamiento farmacológico y/o invasivo, así como un posible retraso en la administración del tratamiento sistémico. Todo ello, a pesar de prescribir un tratamiento con dosis homogéneas a nuestro volumen de tratamientoy con una mediana de dosis total administrada al tumor de 60 Gy, a un fraccionamiento convencional. Este evento común se ha descrito en la bibliografía existente como resultado de la concomitancia de ambos tratamientos (CRT), ya que la quimioterapia basada en platinos empleada en el tratamiento del CP sensibiliza a estos pacientes a la radioterapia (162-164). La radio(quimio)terapia concomitante se asoció con esofagitis aguda grado 2 en el análisis univariante pero no para el grado 3, mucho más grave y potencialmente mortal en algunos casos, que requiere nutrición enteral y/o parenteral. Por lo tanto, la administración simultánea de ambos tratamientos podría contribuir a los casos de toxicidad moderada de esofagitis, pudiendo corresponder los grados más severos a la variabilidad de la respuesta tisular normal de cada paciente.

Alternativamente, los factores dosimétricos tales como el porcentaje de volumen del esófago que recibe una cierta dosis de irradiación (Gy) así como la

correcta delimitación del esófago como órgano de riesgo podrían ser factores dosimétricos predictivos para la esofagitis. Las dosis altas de radioterapia parecen aumentar el riesgo de desarrollar esofagitis sintomática, especialmente cuando la quimioterapia se administra de manera concomitante. Las dosis altas de radioterapia junto con quimioterapia concomitante dan como resultado una peor supervivencia, en parte debido quizás a mayores niveles de toxicidad, lo que sugiere que aún no se habría alcanzado la dosis óptima (radical) de RT (165). En 2016 Ramroth et al. realizaron un meta-análisis con los datos publicados de ensayos aleatorios para examinar si los regímenes de radioterapia con dosis biológicamente equivalentes más altas (teniendo en cuenta todos los fraccionamientos diferentes) se asociaban a una mayor supervivencia (166). Se analizaron 3795 pacientes diagnosticados de NSCLC tratados con RT exclusiva y CRT. En los ensayos con quimioterapia concurrente, las dosis más altas de radioterapia reflejaron una menor supervivencia, posiblemente causada, o al menos en parte, por altos niveles de toxicidad. Cuando se administró radioterapia sin quimioterapia, las dosis de radioterapia progresivamente más altas dieron como resultado una supervivencia progresivamente más prolongada, y no se encontró un nivel de dosis superior por encima del cual no hubo ningún beneficio adicional. Estos hallazgos apoyan la importancia de la escalada de dosis de radioterapia en el CP, haciendo uso de técnicas de RT más modernas para reducir la toxicidad, bien sea cuando se administran de manera exclusiva o cuando se administran con quimioterapia (secuencial y/o concomitante) .

En el presente estudio se propone la asociación entre 9 SNPs del gen TGF- β 1, 2 de ellos vinculados históricamente al riesgo de desarrollo de esofagitis inducida por radioterapia (rs1800469 y rs2868371), como una alternativa no invasiva tanto para el diagnóstico molecular como para la monitorización del tratamiento. En primer lugar, no encontramos evidencia de asociación entre el rs1800469 y el rs2868371 en nuestra cohorte. La asociación entre los genotipos rs1800469 GA / AA con el desarrollo de RIET aguda grado ≥ 2 se describió en la población china estudiando 21 polimorfismos de 14 genes en 213 pacientes con cáncer de pulmón en estadio III (133). Posteriormente se confirmó en un estudio estadounidense que estudió 97 pacientes con diagnóstico de NSCLC (validándose mediante una cohorte retrospectiva) concluyendo que el genotipo TGF- β 1 rs1800469 C-509T se asocia al riesgo de desarrollar toxicidad esofágica grave grado ≥ 3 (167).

Las marcadas diferencias interindividuales en el desarrollo de cáncer y la variabilidad en la respuesta obtenida a los distintos tratamientos pueden ser marcadores de las diferencias en la susceptibilidad genética. La distribución de los SNPs es muy diferente entre distintas etnias y, de alguna manera, los alelos polimórficos pueden estar bajo selección negativa o positiva en una población. La distribución del genotipo rs1800469 es sustancialmente diferente en comparación con la que se encuentra en nuestra población. En relación al rs2868371, un estudio americano reflejó un mayor riesgo de RIET grado ≥ 3 con homocigosis para el alelo más común C (168), con una distribución de genotipos muy similar a la nuestra (60% CC, 35% CG, 5% GG vs 55,8% CC,

36% CG, 8,2% GG). Sin embargo, los antecedentes étnicos deben considerarse cuidadosamente dado que algunos sesgos pueden afectar a los resultados anteriores debido al pequeño tamaño muestral y por tratarse del análisis de la población de una única institución.

En cuanto a los SNPs analizados que no se han descrito previamente en la literatura, los resultados obtenidos en nuestro estudio demuestran que aquellos pacientes portadores del genotipo rs7459185 CC del gen HSP- β 1 presentan un riesgo significativamente mayor de RIET aguda, mientras que pacientes con CP y los genotipos TT / TG para el SNP rs11466353 del gen TGF- β 1 están asociados a una mayor susceptibilidad para el desarrollo de esofagitis tras la radioterapia. La asociación entre estos genotipos y el mayor riesgo de desarrollar RIET fue independiente de otros factores clínico-patológicos y terapéuticos. Estos SNPs están dentro de la secuencia de TGF- β 1 y HSP- β 1 que son extensamente conocidos por su papel en la respuesta clínica a la RT y que anteriormente habían sido descritos como biomarcadores de tolerancia a la misma (130, 169, 170).

Por un lado, se ha establecido que TGF- β 1 está asociado con la inflamación inducida por radiación como un principal promotor en el desarrollo y persistencia de la fibrosis. TGF- β 1 tiene una multitud de funciones, que incluyen favorecer la formación de tejido conectivo así como inhibir su descomposición, y además inhibir la proliferación de células epiteliales. El gen TGF- β 1 se sobreexpresa en los tejidos que presentan lesiones por toxicidad secundarias a la radioterapia y a la quimioterapia. Por lo tanto, TGF- β 1

representa un objetivo lógico para las terapias moleculares diseñadas para prevenir o reducir la lesión tisular después de los tratamientos oncoespecíficos (171-173). Anscher describió el papel crítico de TGF- β 1 en el desarrollo de la lesión en el tejido sano tras los tratamientos de CRT, su investigación acerca de las terapias dirigidas frente a la vía de TGF- β 1 en modelos animales, mostró una clara reducción en la severidad de lesión tisular normal. Por su parte, Carl et al. comprobaron en modelos in vitro que la radiación ionizante sobre células de CP desencadena la síntesis y secreción de TGF- β 1, así como la activación de la señalización intracelular de TGF- β 1, de tal modo que la hiperactivación de la señalización de TGF- β 1 durante la radioterapia contribuiría a la quimiorresistencia de las células tumorales.

Por otra parte, la radiación ionizante induce la liberación TGF- β 1, y en general la literatura sugiere que los niveles de TGF- β 1 en plasma pueden tener un valor potencial para predecir la toxicidad en pacientes con CP (174, 175). Por ejemplo, Wang et al. realizaron un estudio de validación con 143 pacientes en estadio I-III de NSCLC en el cual se describió TGF- β 1 como predictor de riesgo del desarrollo de toxicidad pulmonar grado 2. Sin embargo, la medición de TGF- β 1 en plasma es difícil debido a su reproducibilidad, mientras que el ADN es más estable y fácil de analizar, lo que brinda la oportunidad de individualizar el tratamiento. Así, el uso de los SNPs de TGF- β 1 establecidos como biomarcadores predictivos de respuesta es bastante conveniente. La asociación estadísticamente significativa entre el genotipo rs11466353 TT y la

esofagitis tardía podría ser un biomarcador pronóstico y jugaría un papel importante en los resultados clínicos de pacientes con CP sometidos a CRT.

Por otro lado, el genotipo rs7459185 CC dentro del gen HSP- β 1 aumenta el riesgo de esofagitis aguda grado 3 en pacientes con CP. HSP- β 1 también es conocido por su función en la prevención del daño celular inducido por el estrés y la estabilidad de la proteína que es fuertemente inducida por diferentes factores de estrés que incluyen la radiación ionizante (176-178). En este sentido, los altos niveles de expresión de HSP- β 1 mejoran la capacidad antioxidante de la radiación ionizante. Por lo tanto, una regulación negativa de HSP- β 1 desencadenada por el alelo de riesgo rs7459185 C puede aumentar la sensibilidad celular a la RT, promoviendo la RIET, lo que puede explicar en parte los mecanismos biológicos subyacentes de las asociaciones observadas en nuestro estudio.

C ONCLUSIONES

1. Las diferencias individuales en la supervivencia y toxicidad esofágica de los pacientes analizados con cáncer de pulmón se deben a factores como la edad, la comorbilidad, el tipo de tratamiento recibido, etc. Hemos demostrado que las variabilidades biológicas interpersonales también contribuyen a esta diversidad en la respuesta de la enfermedad en estos pacientes.
2. La tolerancia a los tratamientos varía considerablemente entre individuos dependiendo de los efectos combinados de diferentes alteraciones genéticas y determinadas variables clínico-patológicas de los pacientes.
3. Con este estudio se logró identificar variantes genéticas asociadas con el desarrollo de los efectos secundarios en el esófago a corto y largo plazo tras la RT con el fin de clasificar a los pacientes con CP en diferentes grupos de riesgo.
4. Hasta donde sabemos, esta es la primera evidencia de que la presencia de diferentes genotipos de ambos SNPs (rs7459185 HSP- β 1 / rs11466353 TGF- β 1) pueden predecir, respectivamente, el riesgo de RIET aguda o tardía en pacientes con cáncer de pulmón tratados con CRT.
5. Junto con los factores dosimétricos de RT, la prueba genética realizada en el presente estudio podría usarse como un biomarcador predictivo a la hora de la prescripción de una radioterapia más dirigida y personalizada.

6. En base a los resultados de nuestro estudio, se podría po poner un estudio aleatorizado planteando para el brazo experimental con los SNPs de alto riesgo aquellas medidas que puedan hacer mejorar su supervivencia (ej. asociación/adyuvancia con terapias dirigidas como inmunoterapia, etc) o toxicidad (ej. medidas profilácticas con AINEs o mayores limitaciones de dosis en esófago que las convencionales) con el fin de comprobar si un tratamiento individualizado mejora los resultados en los pacientes con cáncer de pulmón.

BIBLIOGRAFÍA

1. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2018;68(6):394-424.
2. Zurriaga O, Vanaclocha H, Martinez-Beneito MA, Botella-Rocamora P. Spatio-temporal evolution of female lung cancer mortality in a region of Spain, is it worth taking migration into account? *BMC cancer.* 2008;8:35.
3. Win T, Sharples L, Groves AM, Ritchie AJ, Wells FC, Laroche CM. Predicting survival in potentially curable lung cancer patients. *Lung.* 2008;186(2):97-102.
4. Disease GBD, Injury I, Prevalence C. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 310 diseases and injuries, 1990-2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet.* 2016;388(10053):1545-602.
5. Cronin KA, Lake AJ, Scott S, Sherman RL, Noone AM, Howlader N, et al. Annual Report to the Nation on the Status of Cancer, part I: National cancer statistics. *Cancer.* 2018;124(13):2785-800.
6. Wong MCS, Lao XQ, Ho KF, Goggins WB, Tse SLA. Incidence and mortality of lung cancer: global trends and association with socioeconomic status. *Sci Rep.* 2017;7(1):14300.
7. Lortet-Tieulent J, Renteria E, Sharp L, Weiderpass E, Comber H, Baas P, et al. Convergence of decreasing male and increasing female

- incidence rates in major tobacco-related cancers in Europe in 1988-2010. Eur J Cancer. 2015;51(9):1144-63.
8. Jemal A, Miller KD, Ma J, Siegel RL, Fedewa SA, Islami F, et al. Higher Lung Cancer Incidence in Young Women Than Young Men in the United States. N Engl J Med. 2018;378(21):1999-2009.
 9. Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, Dyba T, Randi G, Bettio M, et al. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries and 25 major cancers in 2018. Eur J Cancer. 2018;103:356-87.
 10. Detterbeck FC, Boffa DJ, Kim AW, Tanoue LT. The Eighth Edition Lung Cancer Stage Classification. Chest. 2017;151(1):193-203.
 11. Zelen M. Keynote address on biostatistics and data retrieval. Cancer Chemother Rep 3. 1973;4(2):31-42.
 12. Nicholson AG, Chansky K, Crowley J, Beyruti R, Kubota K, Turrisi A, et al. The International Association for the Study of Lung Cancer Lung Cancer Staging Project: Proposals for the Revision of the Clinical and Pathologic Staging of Small Cell Lung Cancer in the Forthcoming Eighth Edition of the TNM Classification for Lung Cancer. J Thorac Oncol. 2016;11(3):300-11.
 13. L. B. Cáncer de pulmón. Pharmacotherapy Self Assessment Program- Hematología y Oncología. 1ªed. Barcelona ed2006. p. p.61-107.

14. Douillard JY, Laporte S, Fossella F, Georgoulas V, Pujol JL, Kubota K, et al. Comparison of docetaxel- and vinca alkaloid-based chemotherapy in the first-line treatment of advanced non-small cell lung cancer: a meta-analysis of seven randomized clinical trials. *J Thorac Oncol.* 2007;2(10):939-46.
15. Fong KM, Yang IA, Zimmerman PV, Bowman RV. Cochrane systematic reviews of treatments for lung cancer. *Respir Med.* 2005;99(9):1071-8.
16. Manser RL, Irving LB, de Campo MP, Abramson MJ, Stone CA, Pedersen KE, et al. Overview of observational studies of low-dose helical computed tomography screening for lung cancer. *Respirology.* 2005;10(1):97-104.
17. Goldstraw P, Chansky K, Crowley J, Rami-Porta R, Asamura H, Eberhardt WE, et al. The IASLC Lung Cancer Staging Project: Proposals for Revision of the TNM Stage Groupings in the Forthcoming (Eighth) Edition of the TNM Classification for Lung Cancer. *J Thorac Oncol.* 2016;11(1):39-51.
18. Haiman CA, Stram DO, Wilkens LR, Pike MC, Kolonel LN, Henderson BE, et al. Ethnic and racial differences in the smoking-related risk of lung cancer. *N Engl J Med.* 2006;354(4):333-42.
19. Loomis D, Grosse Y, Lauby-Secretan B, El Ghissassi F, Bouvard V, Benbrahim-Tallaa L, et al. The carcinogenicity of outdoor air pollution. *Lancet Oncol.* 2013;14(13):1262-3.

20. Jemal A, Center MM, DeSantis C, Ward EM. Global patterns of cancer incidence and mortality rates and trends. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2010;19(8):1893-907.
21. Zhou SY, Liberman JD, Ricafort E. The impact of the WHO Framework Convention on Tobacco Control in defending legal challenges to tobacco control measures. *Tob Control.* 2018.
22. Larsen JE, Minna JD. Molecular biology of lung cancer: clinical implications. *Clin Chest Med.* 2011;32(4):703-40.
23. Pastor MD, Nogal A, Molina-Pinelo S, Melendez R, Salinas A, Gonzalez De la Pena M, et al. Identification of proteomic signatures associated with lung cancer and COPD. *J Proteomics.* 2013;89:227-37.
24. Miller VA, Riely GJ, Zakowski MF, Li AR, Patel JD, Heelan RT, et al. Molecular characteristics of bronchioloalveolar carcinoma and adenocarcinoma, bronchioloalveolar carcinoma subtype, predict response to erlotinib. *J Clin Oncol.* 2008;26(9):1472-8.
25. Sequist LV, Martins RG, Spigel D, Grunberg SM, Spira A, Janne PA, et al. First-line gefitinib in patients with advanced non-small-cell lung cancer harboring somatic EGFR mutations. *J Clin Oncol.* 2008;26(15):2442-9.
26. Tsao MS, Sakurada A, Cutz JC, Zhu CQ, Kamel-Reid S, Squire J, et al. Erlotinib in lung cancer - molecular and clinical predictors of outcome. *N Engl J Med.* 2005;353(2):133-44.

27. Mazieres J, Zalcman G, Crino L, Biondani P, Barlesi F, Filleron T, et al. Crizotinib therapy for advanced lung adenocarcinoma and a ROS1 rearrangement: results from the EUROS1 cohort. *J Clin Oncol*. 2015;33(9):992-9.
28. Shaw AT, Solomon BJ. Crizotinib in ROS1-rearranged non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med*. 2015;372(7):683-4.
29. Drilon A, Wang L, Hasanovic A, Suehara Y, Lipson D, Stephens P, et al. Response to Cabozantinib in patients with RET fusion-positive lung adenocarcinomas. *Cancer Discov*. 2013;3(6):630-5.
30. Bergethon K, Shaw AT, Ou SH, Katayama R, Lovly CM, McDonald NT, et al. ROS1 rearrangements define a unique molecular class of lung cancers. *J Clin Oncol*. 2012;30(8):863-70.
31. Kohno T, Nakaoku T, Tsuta K, Tsuchihara K, Matsumoto S, Yoh K, et al. Beyond ALK-RET, ROS1 and other oncogene fusions in lung cancer. *Transl Lung Cancer Res*. 2015;4(2):156-64.
32. Ou SH, Ahn JS, De Petris L, Govindan R, Yang JC, Hughes B, et al. Alectinib in Crizotinib-Refractory ALK-Rearranged Non-Small-Cell Lung Cancer: A Phase II Global Study. *J Clin Oncol*. 2016;34(7):661-8.
33. Douillard JY, Ostoros G, Cobo M, Ciuleanu T, McCormack R, Webster A, et al. First-line gefitinib in Caucasian EGFR mutation-positive NSCLC patients: a phase-IV, open-label, single-arm study. *Br J Cancer*. 2014;110(1):55-62.

34. Besse B, Adjei A, Baas P, Meldgaard P, Nicolson M, Paz-Ares L, et al. 2nd ESMO Consensus Conference on Lung Cancer: non-small-cell lung cancer first-line/second and further lines of treatment in advanced disease. *Ann Oncol.* 2014;25(8):1475-84.
35. Kerr KM, Bubendorf L, Edelman MJ, Marchetti A, Mok T, Novello S, et al. Second ESMO consensus conference on lung cancer: pathology and molecular biomarkers for non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol.* 2014;25(9):1681-90.
36. Lindeman NI, Cagle PT, Beasley MB, Chitale DA, Dacic S, Giaccone G, et al. Molecular testing guideline for selection of lung cancer patients for EGFR and ALK tyrosine kinase inhibitors: guideline from the College of American Pathologists, International Association for the Study of Lung Cancer, and Association for Molecular Pathology. *J Thorac Oncol.* 2013;8(7):823-59.
37. Paik PK, Varghese AM, Sima CS, Moreira AL, Ladanyi M, Kris MG, et al. Response to erlotinib in patients with EGFR mutant advanced non-small cell lung cancers with a squamous or squamous-like component. *Mol Cancer Ther.* 2012;11(11):2535-40.
38. Wong DW, Leung EL, So KK, Tam IY, Sihoe AD, Cheng LC, et al. The EML4-ALK fusion gene is involved in various histologic types of lung cancers from nonsmokers with wild-type EGFR and KRAS. *Cancer.* 2009;115(8):1723-33.

39. Tate JG, Bamford S, Jubb HC, Sondka Z, Beare DM, Bindal N, et al. COSMIC: the Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer. *Nucleic Acids Res.* 2019;47(D1):D941-D7.
40. Sholl LM, Aisner DL, Varella-Garcia M, Berry LD, Dias-Santagata D, Wistuba II, et al. Multi-institutional Oncogenic Driver Mutation Analysis in Lung Adenocarcinoma: The Lung Cancer Mutation Consortium Experience. *J Thorac Oncol.* 2015;10(5):768-77.
41. Ali G, Proietti A, Pelliccioni S, Niccoli C, Lupi C, Sensi E, et al. ALK rearrangement in a large series of consecutive non-small cell lung cancers: comparison between a new immunohistochemical approach and fluorescence in situ hybridization for the screening of patients eligible for crizotinib treatment. *Arch Pathol Lab Med.* 2014;138(11):1449-58.
42. Planchard D, Besse B, Groen HJM, Souquet PJ, Quoix E, Baik CS, et al. Dabrafenib plus trametinib in patients with previously treated BRAF(V600E)-mutant metastatic non-small cell lung cancer: an open-label, multicentre phase 2 trial. *Lancet Oncol.* 2016;17(7):984-93.
43. Gautschi O, Milia J, Cabarrou B, Bluthgen MV, Besse B, Smit EF, et al. Targeted Therapy for Patients with BRAF-Mutant Lung Cancer: Results from the European EURAF Cohort. *J Thorac Oncol.* 2015;10(10):1451-7.
44. Klempner SJ, Borghei A, Hakimian B, Ali SM, Ou SI. Intracranial Activity of Cabozantinib in MET Exon 14-Positive NSCLC with Brain Metastases. *J Thorac Oncol.* 2017;12(1):152-6.

45. Frampton GM, Ali SM, Rosenzweig M, Chmielecki J, Lu X, Bauer TM, et al. Activation of MET via diverse exon 14 splicing alterations occurs in multiple tumor types and confers clinical sensitivity to MET inhibitors. *Cancer Discov.* 2015;5(8):850-9.
46. Kelly RJ, Carter CA, Giaccone G. HER2 mutations in non-small-cell lung cancer can be continually targeted. *J Clin Oncol.* 2012;30(26):3318-9.
47. Slebos RJ, Kibbelaar RE, Dalesio O, Kooistra A, Stam J, Meijer CJ, et al. K-ras oncogene activation as a prognostic marker in adenocarcinoma of the lung. *N Engl J Med.* 1990;323(9):561-5.
48. Roberts PJ, Stinchcombe TE. KRAS mutation: should we test for it, and does it matter? *J Clin Oncol.* 2013;31(8):1112-21.
49. Tsao MS, Aviel-Ronen S, Ding K, Lau D, Liu N, Sakurada A, et al. Prognostic and predictive importance of p53 and RAS for adjuvant chemotherapy in non small-cell lung cancer. *J Clin Oncol.* 2007;25(33):5240-7.
50. Pao W, Girard N. New driver mutations in non-small-cell lung cancer. *Lancet Oncol.* 2011;12(2):175-80.
51. Emami B, Lyman J, Brown A, Coia L, Goitein M, Munzenrider JE, et al. Tolerance of normal tissue to therapeutic irradiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1991;21(1):109-22.

52. Bentzen SM, Constine LS, Deasy JO, Eisbruch A, Jackson A, Marks LB, et al. Quantitative Analyses of Normal Tissue Effects in the Clinic (QUANTEC): an introduction to the scientific issues. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2010;76(3 Suppl):S3-9.
53. Geiger GA, Kim MB, Xanthopoulos EP, Pryma DA, Grover S, Plastaras JP, et al. Stage migration in planning PET/CT scans in patients due to receive radiotherapy for non-small-cell lung cancer. *Clin Lung Cancer.* 2014;15(1):79-85.
54. Fleckenstein J, Hellwig D, Kremp S, Grgic A, Groschel A, Kirsch CM, et al. F-18-FDG-PET confined radiotherapy of locally advanced NSCLC with concomitant chemotherapy: results of the PET-PLAN pilot trial. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2011;81(4):e283-9.
55. Rodriguez N, Sanz X, Trampal C, Foro P, Reig A, Lacruz M, et al. 18F-FDG PET definition of gross tumor volume for radiotherapy of lung cancer: is the tumor uptake value-based approach appropriate for lymph node delineation? *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2010;78(3):659-66.
56. Jiang ZQ, Yang K, Komaki R, Wei X, Tucker SL, Zhuang Y, et al. Long-term clinical outcome of intensity-modulated radiotherapy for inoperable non-small cell lung cancer: the MD Anderson experience. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2012;83(1):332-9.
57. Liao ZX, Komaki RR, Thames HD, Jr., Liu HH, Tucker SL, Mohan R, et al. Influence of technologic advances on outcomes in patients with

- unresectable, locally advanced non-small-cell lung cancer receiving concomitant chemoradiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2010;76(3):775-81.
58. Tucker SL, Jin H, Wei X, Wang S, Martel MK, Komaki R, et al. Impact of toxicity grade and scoring system on the relationship between mean lung dose and risk of radiation pneumonitis in a large cohort of patients with non-small cell lung cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2010;77(3):691-8.
59. Bradley J, Movsas B. Radiation esophagitis: Predictive factors and preventive strategies. *Semin Radiat Oncol.* 2004;14(4):280-6.
60. Murro D, Jakate S. Radiation esophagitis. *Arch Pathol Lab Med.* 2015;139(6):827-30.
61. Takada M, Fukuoka M, Kawahara M, Sugiura T, Yokoyama A, Yokota S, et al. Phase III study of concurrent versus sequential thoracic radiotherapy in combination with cisplatin and etoposide for limited-stage small-cell lung cancer: results of the Japan Clinical Oncology Group Study 9104. *J Clin Oncol.* 2002;20(14):3054-60.
62. Charles M. UNSCEAR report 2000: sources and effects of ionizing radiation. United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation. *J Radiol Prot.* 2001;21(1):83-6.
63. Werner-Wasik M, Paulus R, Curran WJ, Jr., Byhardt R. Acute esophagitis and late lung toxicity in concurrent chemoradiotherapy trials

- in patients with locally advanced non-small-cell lung cancer: analysis of the radiation therapy oncology group (RTOG) database. *Clin Lung Cancer*. 2011;12(4):245-51.
64. Ahn SJ, Kahn D, Zhou S, Yu X, Hollis D, Shafman TD, et al. Dosimetric and clinical predictors for radiation-induced esophageal injury. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2005;61(2):335-47.
65. Gomez DR, Hunt MA, Jackson A, O'Meara WP, Bukanova EN, Zelefsky MJ, et al. Low rate of thoracic toxicity in palliative paraspinal single-fraction stereotactic body radiation therapy. *Radiother Oncol*. 2009;93(3):414-8.
66. Spiro SG, Douse J, Read C, Janes S. Complications of lung cancer treatment. *Semin Respir Crit Care Med*. 2008;29(3):302-17.
67. Werner-Wasik M, Yorke E, Deasy J, Nam J, Marks LB. Radiation dose-volume effects in the esophagus. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2010;76(3 Suppl):S86-93.
68. Nesheiwat Z, Mahajan K. Esophagitis, Radiation. *StatPearls*. Treasure Island (FL)2018.
69. Hirota S, Tsujino K, Hishikawa Y, Watanabe H, Kono K, Soejima T, et al. Endoscopic findings of radiation esophagitis in concurrent chemoradiotherapy for intrathoracic malignancies. *Radiother Oncol*. 2001;58(3):273-8.

70. Bar-Ad V, Ohri N, Werner-Wasik M. Esophagitis, treatment-related toxicity in non-small cell lung cancer. *Rev Recent Clin Trials*. 2012;7(1):31-5.
71. Howell DD. The role of radiation therapy in the palliation of gastrointestinal malignancies. *Gastroenterol Clin North Am*. 2006;35(1):125-30.
72. Puukila S, Thome C, Brooks AL, Woloschak G, Boreham DR. The Role of Radiation Induced Injury on Lung Cancer. *Cancers (Basel)*. 2017;9(7).
73. Kassam Z, Wong RK, Ringash J, Ung Y, Kamra J, DeBoer G, et al. A phase I/II study to evaluate the toxicity and efficacy of accelerated fractionation radiotherapy for the palliation of dysphagia from carcinoma of the oesophagus. *Clinical oncology*. 2008;20(1):53-60.
74. Challand T, Thureau S, Dubray B, Giraud P. [Esophageal toxicity of radiation therapy: clinical risk factors and management]. *Cancer Radiother*. 2012;16(5-6):364-71.
75. Davidoff AJ, Gardner JF, Seal B, Edelman MJ. Population-based estimates of survival benefit associated with combined modality therapy in elderly patients with locally advanced non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol*. 2011;6(5):934-41.
76. Patel AB, Edelman MJ, Kwok Y, Krasna MJ, Suntharalingam M. Predictors of acute esophagitis in patients with non-small-cell lung carcinoma treated with concurrent chemotherapy and hyperfractionated

- radiotherapy followed by surgery. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2004;60(4):1106-12.
77. Singh AK, Lockett MA, Bradley JD. Predictors of radiation-induced esophageal toxicity in patients with non-small-cell lung cancer treated with three-dimensional conformal radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2003;55(2):337-41.
78. De Ruyscher D, Dehing C, Bremer RH, Bentzen SM, Koppe F, Pijls-Johannesma M, et al. Maximal neutropenia during chemotherapy and radiotherapy is significantly associated with the development of acute radiation-induced dysphagia in lung cancer patients. *Ann Oncol.* 2007;18(5):909-16.
79. Lutz ST, Chow EL, Hartsell WF, Konski AA. A review of hypofractionated palliative radiotherapy. *Cancer.* 2007;109(8):1462-70.
80. Baker S, Fairchild A. Radiation-induced esophagitis in lung cancer. *Lung Cancer (Auckl).* 2016;7:119-27.
81. O'Rourke N, Roque IFM, Farre Bernado N, Macbeth F. Concurrent chemoradiotherapy in non-small cell lung cancer. *Cochrane Database Syst Rev.* 2010(6):CD002140.
82. Kim TH, Cho KH, Pyo HR, Lee JS, Han JY, Zo JI, et al. Dose-volumetric parameters of acute esophageal toxicity in patients with lung cancer treated with three-dimensional conformal radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2005;62(4):995-1002.

83. Wei X, Liu HH, Tucker SL, Liao Z, Hu C, Mohan R, et al. Risk factors for acute esophagitis in non-small-cell lung cancer patients treated with concurrent chemotherapy and three-dimensional conformal radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2006;66(1):100-7.
84. Takeda K, Nemoto K, Saito H, Ogawa Y, Takai Y, Yamada S. Predictive factors for acute esophageal toxicity in thoracic radiotherapy. *Tohoku J Exp Medt.* 2006;208(4):299-306.
85. Rodriguez N, Algara M, Foro P, Lacruz M, Reig A, Membrive I, et al. Predictors of acute esophagitis in lung cancer patients treated with concurrent three-dimensional conformal radiotherapy and chemotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2009;73(3):810-7.
86. Watkins JM, Wahlquist AE, Shirai K, Garrett-Mayer E, Agüero EG, Fortney JA, et al. Factors associated with severe acute esophagitis from hyperfractionated radiotherapy with concurrent chemotherapy for limited-stage small-cell lung cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2009;74(4):1108-13.
87. Topkan E, Yavuz MN, Onal C, Yavuz AA. Prevention of acute radiation-induced esophagitis with glutamine in non-small cell lung cancer patients treated with radiotherapy: evaluation of clinical and dosimetric parameters. *Lung cancer.* 2009;63(3):393-9.
88. Ozgen A, Hayran M, Kahraman F. Mean esophageal radiation dose is predictive of the grade of acute esophagitis in lung cancer patients

- treated with concurrent radiotherapy and chemotherapy. *J Radiat Res.* 2012;53(6):916-22.
89. Kuroda Y, Sekine I, Sumi M, Sekii S, Takahashi K, Inaba K, et al. Acute radiation esophagitis caused by high-dose involved field radiotherapy with concurrent cisplatin and vinorelbine for stage III non-small cell lung cancer. *Technol Cancer Res Treat.* 2013;12(4):333-9.
90. Zhang Z, Xu J, Zhou T, Yi Y, Li H, Sun H, et al. Risk factors of radiation-induced acute esophagitis in non-small cell lung cancer patients treated with concomitant chemoradiotherapy. *Radiat Oncol.* 2014;9:54.
91. Grant JD, Shirvani SM, Tang C, Juloori A, Rebuena NC, Allen PK, et al. Incidence and predictors of severe acute esophagitis and subsequent esophageal stricture in patients treated with accelerated hyperfractionated chemoradiation for limited-stage small cell lung cancer. *Pract Radiat Oncol.* 2015;5(4):e383-91.
92. Palma DA, Senan S, Oberije C, Belderbos J, de Dios NR, Bradley JD, et al. Predicting esophagitis after chemoradiation therapy for non-small cell lung cancer: an individual patient data meta-analysis. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2013;87(4):690-6.
93. Marks LB, Yorke ED, Jackson A, Ten Haken RK, Constone LS, Eisbruch A, et al. Use of normal tissue complication probability models in the clinic. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2010;76(3 Suppl):S10-9.

94. Bradley J, Deasy JO, Bentzen S, El-Naqa I. Dosimetric correlates for acute esophagitis in patients treated with radiotherapy for lung carcinoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2004;58(4):1106-13.
95. Sayles C, Hickerson SC, Bhat RR, Hall J, Garey KW, Trivedi MV. Oral Glutamine in Preventing Treatment-Related Mucositis in Adult Patients With Cancer: A Systematic Review. *Nutr Clin Pract*. 2016;31(2):171-9.
96. Devine A, Marignol L. Potential of Amifostine for Chemoradiotherapy and Radiotherapy-associated Toxicity Reduction in Advanced NSCLC: A Meta-Analysis. *Anticancer Res*. 2016;36(1):5-12.
97. Perez RA, Early DS. Endoscopy in patients receiving radiation therapy to the thorax. *Dig Dis Sci*. 2002;47(1):79-83.
98. Berkey FJ. Managing the adverse effects of radiation therapy. *Am Fam Physician*. 2010;82(4):381-8, 94.
99. Seres DS, Valcarcel M, Guillaume A. Advantages of enteral nutrition over parenteral nutrition. *Therap Adv Gastroenterol*. 2013;6(2):157-67.
100. Muse G. *A Primer of Genome*. Science. 2004.
101. Polygenic Inheritance and Gene Mapping | Learn Science at Scitable [05.05.2019]. Available from: www.nature.com.
102. Ghadami M, Makita Y, Yoshida K, Nishimura G, Fukushima Y, Wakui K, et al. Genetic mapping of the Camurati-Engelmann disease locus to chromosome 19q13.1-q13.3. *Am J Hum Genet*. 2000;66(1):143-7.

103. Vaughn SP, Broussard S, Hall CR, Scott A, Blanton SH, Milunsky JM, et al. Confirmation of the mapping of the Camurati-Englemann locus to 19q13.2 and refinement to a 3.2-cM region. *Genomics*. 2000;66(1):119-21.
104. Rose AS, Bradley AR, Valasatava Y, Duarte JM, Prlic A, Rose PW. NGL viewer: web-based molecular graphics for large complexes. *Bioinformatics*. 2018;34(21):3755-8.
105. Ciftci R, Tas F, Yasasever CT, Aksit E, Karabulut S, Sen F, et al. High serum transforming growth factor beta 1 (TGFB1) level predicts better survival in breast cancer. *Tumour Biol*. 2014;35(7):6941-8.
106. Berndt SI, Huang WY, Chatterjee N, Yeager M, Welch R, Chanock SJ, et al. Transforming growth factor beta 1 (TGFB1) gene polymorphisms and risk of advanced colorectal adenoma. *Carcinogenesis*. 2007;28(9):1965-70.
107. Letterio JJ, Roberts AB. Regulation of immune responses by TGF-beta. *Annu Rev Immunol*. 1998;16:137-61.
108. Matz JM, Blake MJ, Tatelman HM, Lavoie KP, Holbrook NJ. Characterization and regulation of cold-induced heat shock protein expression in mouse brown adipose tissue. *Am J Physiol*. 1995;269(1 Pt 2):R38-47.

109. Cao Y, Tang H, Zhao HY, Zhang F, Yang Y. TGF-beta and HSP70 expression in human skin fibroblasts after ultraviolet B irradiation. *Zhongguo Ying Yong Sheng Li Xue Za Zhi*. 2002;18(2):166-8.
110. Laplante AF, Moulin V, Auger FA, Landry J, Li H, Morrow G, et al. Expression of heat shock proteins in mouse skin during wound healing. *J Histochem Cytochem*. 1998;46(11):1291-301.
111. Sajjadi AY, Mitra K, Grace M. Expression of heat shock proteins 70 and 47 in tissues following short-pulse laser irradiation: assessment of thermal damage and healing. *Med Eng Phys*. 2013;35(10):1406-14.
112. Crowe J, Aubareda A, McNamee K, Przybycien PM, Lu X, Williams RO, et al. Heat shock protein B1-deficient mice display impaired wound healing. *PLoS One*. 2013;8(10):e77383.
113. De Maio A. Heat shock proteins: facts, thoughts, and dreams. *Shock*. 1999;11(1):1-12.
114. Wu C. Heat shock transcription factors: structure and regulation. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 1995;11:441-69.
115. Hoter A, El-Sabban ME, Naim HY. The HSP90 Family: Structure, Regulation, Function, and Implications in Health and Disease. *Int J Mol Sci*. 2018;19(9).

116. Flaherty KM, DeLuca-Flaherty C, McKay DB. Three-dimensional structure of the ATPase fragment of a 70K heat-shock cognate protein. *Nature*. 1990;346(6285):623-8.
117. Walter S, Buchner J. Molecular chaperones--cellular machines for protein folding. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2002;41(7):1098-113.
118. Benjamin IJ, McMillan DR. Stress (heat shock) proteins: molecular chaperones in cardiovascular biology and disease. *Circ Res*. 1998;83(2):117-32.
119. Antonova G, Lichtenbeld H, Xia T, Chatterjee A, Dimitropoulou C, Catravas JD. Functional significance of hsp90 complexes with NOS and sGC in endothelial cells. *Clin Hemorheol Microcirc*. 2007;37(1-2):19-35.
120. McLemore EC, Tessier DJ, Thresher J, Komalavilas P, Brophy CM. Role of the small heat shock proteins in regulating vascular smooth muscle tone. *J Am Coll Surg*. 2005;201(1):30-6.
121. Tukaj S, Wegrzyn G. Anti-Hsp90 therapy in autoimmune and inflammatory diseases: a review of preclinical studies. *Cell Stress Chaperones*. 2016;21(2):213-8.
122. Graner MW. HSP90 and Immune Modulation in Cancer. *Adv Cancer Res*. 2016;129:191-224.

123. Deffit SN, Blum JS. A central role for HSC70 in regulating antigen trafficking and MHC class II presentation. *Mol Immunol.* 2015;68(2 Pt A):85-8.
124. Wu J, Liu T, Rios Z, Mei Q, Lin X, Cao S. Heat Shock Proteins and Cancer. *Trends Pharmacol Sci.* 2017;38(3):226-56.
125. Didelot C, Lanneau D, Brunet M, Joly AL, De Thonel A, Chiosis G, et al. Anti-cancer therapeutic approaches based on intracellular and extracellular heat shock proteins. *Curr Med Chem.* 2007;14(27):2839-47.
126. Solit DB, Rosen N. Hsp90: a novel target for cancer therapy. *Curr Top Med Chem.* 2006;6(11):1205-14.
127. "Immune Response and Safety of HS110 Vaccine in Combination With Erlotinib in Patients With Non-Small Cell Lung Cancer - Full Text View - ClinicalTrials.gov". *clinicaltrials.gov*. Retrieved 05 May 2019.
128. Yuan X, Liao Z, Liu Z, Wang LE, Tucker SL, Mao L, et al. Single nucleotide polymorphism at rs1982073:T869C of the TGFbeta 1 gene is associated with the risk of radiation pneumonitis in patients with non-small-cell lung cancer treated with definitive radiotherapy. *J Clin Oncol.* 2009;27(20):3370-8.
129. Zhao L, Sheldon K, Chen M, Yin MS, Hayman JA, Kalemkerian GP, et al. The predictive role of plasma TGF-beta1 during radiation therapy for radiation-induced lung toxicity deserves further study in patients with non-small cell lung cancer. *Lung cancer.* 2008;59(2):232-9.

130. Blobel GC, Schiemann WP, Lodish HF. Role of transforming growth factor beta in human disease. *N Engl J Med*. 2000;342(18):1350-8.
131. Hildebrandt MA, Komaki R, Liao Z, Gu J, Chang JY, Ye Y, et al. Genetic variants in inflammation-related genes are associated with radiation-induced toxicity following treatment for non-small cell lung cancer. *PloS one*. 2010;5(8):e12402.
132. Zhang L, Yang M, Bi N, Ji W, Wu C, Tan W, et al. Association of TGF-beta1 and XPD polymorphisms with severe acute radiation-induced esophageal toxicity in locally advanced lung cancer patients treated with radiotherapy. *Radiother Oncol*. 2010;97(1):19-25.
133. Guo H, Bai Y, Xu P, Hu Z, Liu L, Wang F, et al. Functional promoter - 1271G>C variant of HSPB1 predicts lung cancer risk and survival. *J Clin Oncol*. 2010;28(11):1928-35.
134. Xu T, Wei Q, Lopez Guerra JL, Wang LE, Liu Z, Gomez D, et al. HSPB1 gene polymorphisms predict risk of mortality for US patients after radio(chemo)therapy for non-small cell lung cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2012;84(2):e229-35.
135. Cox JD, Stetz J, Pajak TF. Toxicity criteria of the Radiation Therapy Oncology Group (RTOG) and the European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC). *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1995;31(5):1341-6.

136. Measurements. BICoRUa. Prescribing, recording, and reporting photon beam therapy (supplement to ICRU report 50). 1999;62.
137. ACR-ASTRO Practice Guidelines for Radiation Oncology. Available from: https://www.acr.org/SecondaryMainMenuCategories/quality_safety/guidelines/ro.aspx.
138. Rodriguez de Dios N, Counago F, Lopez JL, Calvo P, Murcia M, Rico M, et al. Treatment Design and Rationale for a Randomized Trial of Prophylactic Cranial Irradiation With or Without Hippocampal Avoidance for SCLC: PREMIER Trial on Behalf of the Oncologic Group for the Study of Lung Cancer/Spanish Radiation Oncology Group-Radiation Oncology Clinical Research Group. Clin Lung Cancer. 2018;19(5):e693-e7.
139. Garg S, Gielda BT, Kiel K, Turian JV, Fidler MJ, Batus M, et al. Patterns of locoregional failure in stage III non-small cell lung cancer treated with definitive chemoradiation therapy. Pract Radiat Oncol. 2014;4(5):342-8.
140. Jouglar E, Isnardi V, Goulon D, Segura-Ferlay C, Ayadi M, Dupuy C, et al. Patterns of locoregional failure in locally advanced non-small cell lung cancer treated with definitive conformal radiotherapy: Results from the Gating 2006 trial. Radiother Oncol. 2018;126(2):291-9.
141. Togashi Y, Masago K, Fujita S, Kim YH, Sakamori Y, Hatachi Y, et al. Association of the transforming growth factor ss1 promoter polymorphism, C-509T, with smoking status and survival in advanced non-small cell lung cancer. Oncol Rep. 2011;25(2):377-82.

142. Lin M, Stewart DJ, Spitz MR, Hildebrandt MA, Lu C, Lin J, et al. Genetic variations in the transforming growth factor-beta pathway as predictors of survival in advanced non-small cell lung cancer. *Carcinogenesis*. 2011;32(7):1050-6.
143. Anscher MS, Chen L, Rabbani Z, Kang S, Larrier N, Huang H, et al. Recent progress in defining mechanisms and potential targets for prevention of normal tissue injury after radiation therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2005;62(1):255-9.
144. Aloy MT, Hadchity E, Bionda C, Diaz-Latoud C, Claude L, Rousson R, et al. Protective role of Hsp27 protein against gamma radiation-induced apoptosis and radiosensitization effects of Hsp27 gene silencing in different human tumor cells. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2008;70(2):543-53.
145. Wei L, Liu TT, Wang HH, Hong HM, Yu AL, Feng HP, et al. Hsp27 participates in the maintenance of breast cancer stem cells through regulation of epithelial-mesenchymal transition and nuclear factor-kappaB. *Breast Cancer Res*. 2011;13(5):R101.
146. Romani AA, Crafa P, Desenzani S, Graiani G, Lagrasta C, Sianesi M, et al. The expression of HSP27 is associated with poor clinical outcome in intrahepatic cholangiocarcinoma. *BMC cancer*. 2007;7:232.

147. Zhang Y, Tao X, Jin G, Jin H, Wang N, Hu F, et al. A Targetable Molecular Chaperone Hsp27 Confers Aggressiveness in Hepatocellular Carcinoma. *Theranostics*. 2016;6(4):558-70.
148. Andrieu C, Taieb D, Baylot V, Ettinger S, Soubeyran P, De-Thonel A, et al. Heat shock protein 27 confers resistance to androgen ablation and chemotherapy in prostate cancer cells through eIF4E. *Oncogene*. 2010;29(13):1883-96.
149. Stope MB, Weiss M, Preuss M, Streitborger A, Ritter CA, Zimmermann U, et al. Immediate and transient phosphorylation of the heat shock protein 27 initiates chemoresistance in prostate cancer cells. *Oncol Rep*. 2014;32(6):2380-6.
150. Ciocca DR, Calderwood SK. Heat shock proteins in cancer: diagnostic, prognostic, predictive, and treatment implications. *Cell Stress Chaperones*. 2005;10(2):86-103.
151. Arrigo AP, Gibert B. HspB1, HspB5 and HspB4 in Human Cancers: Potent Oncogenic Role of Some of Their Client Proteins. *Cancers (Basel)*. 2014;6(1):333-65.
152. Kapranos N, Kominea A, Konstantinopoulos PA, Savva S, Artelaris S, Vondoros G, et al. Expression of the 27-kDa heat shock protein (HSP27) in gastric carcinomas and adjacent normal, metaplastic, and dysplastic gastric mucosa, and its prognostic significance. *J Clin Oncol*. 2002;128(8):426-32.

153. Trieb K, Lechleitner T, Lang S, Windhager R, Kotz R, Dirnhofer S. Heat shock protein 72 expression in osteosarcomas correlates with good response to neoadjuvant chemotherapy. *Hum Pathol.* 1998;29(10):1050-5.
154. Rocchi P, So A, Kojima S, Signaevsky M, Beraldi E, Fazli L, et al. Heat shock protein 27 increases after androgen ablation and plays a cytoprotective role in hormone-refractory prostate cancer. *Cancer Res.* 2004;64(18):6595-602.
155. Wang Y, Theriault JR, He H, Gong J, Calderwood SK. Expression of a dominant negative heat shock factor-1 construct inhibits aneuploidy in prostate carcinoma cells. *J Biol Chem.* 2004;279(31):32651-9.
156. Katsogiannou M, Andrieu C, Rocchi P. Heat shock protein 27 phosphorylation state is associated with cancer progression. *Front Genet.* 2014;5:346.
157. Zhang S, Hu Y, Huang Y, Xu H, Wu G, Dai H. Heat shock protein 27 promotes cell proliferation through activator protein-1 in lung cancer. *Oncol Lett.* 2015;9(6):2572-6.
158. Huang ZC, Li H, Sun ZQ, Zheng J, Zhao RK, Chen J, et al. Distinct prognostic roles of HSPB1 expression in non-small cell lung cancer. *Neoplasma.* 2018;65(1):161-6.

159. Tsuruta M, Nishibori H, Hasegawa H, Ishii Y, Endo T, Kubota T, et al. Heat shock protein 27, a novel regulator of 5-fluorouracil resistance in colon cancer. *Oncol Rep.* 2008;20(5):1165-72.
160. Chi KN, Yu EY, Jacobs C, Bazov J, Kollmannsberger C, Higano CS, et al. A phase I dose-escalation study of apatorsen (OGX-427), an antisense inhibitor targeting heat shock protein 27 (Hsp27), in patients with castration-resistant prostate cancer and other advanced cancers. *Ann Oncol.* 2016;27(6):1116-22.
161. Zhang ZC, Xu J, Li BS, Zhou T, Lu J, Wang ZT, et al. Clinical and dosimetric risk factors of acute esophagitis in patients treated with 3-dimensional conformal radiotherapy for non-small-cell lung cancer. *Am J Clin Oncol.* 2010;33(3):271-5.
162. Belderbos J, Heemsbergen W, Hoogeman M, Pongel K, Rossi M, Lebesque J. Acute esophageal toxicity in non-small cell lung cancer patients after high dose conformal radiotherapy. *Radiother Oncol.* 2005;75(2):157-64.
163. Bar-Ad V, Leiby B, Witek M, Xiao Y, Cui Y, Dai Y, et al. Treatment-related acute esophagitis for patients with locoregionally advanced non-small cell lung cancer treated with involved-field radiotherapy and concurrent chemotherapy. *Am J Clin Oncol.* 2014;37(5):433-7.
164. Eaton BR, Pugh SL, Bradley JD, Masters G, Kavadi VS, Narayan S, et al. Institutional Enrollment and Survival Among NSCLC Patients

- Receiving Chemoradiation: NRG Oncology Radiation Therapy Oncology Group (RTOG) 0617. *J Natl Cancer Inst.* 2016;108(9).
165. Ramroth J, Cutter DJ, Darby SC, Higgins GS, McGale P, Partridge M, et al. Dose and Fractionation in Radiation Therapy of Curative Intent for Non-Small Cell Lung Cancer: Meta-Analysis of Randomized Trials. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2016;96(4):736-47.
166. Guerra JL, Gomez D, Wei Q, Liu Z, Wang LE, Yuan X, et al. Association between single nucleotide polymorphisms of the transforming growth factor beta1 gene and the risk of severe radiation esophagitis in patients with lung cancer. *Radiother Oncol.* 2012;105(3):299-304.
167. Lopez Guerra JL, Wei Q, Yuan X, Gomez D, Liu Z, Zhuang Y, et al. Functional promoter rs2868371 variant of HSPB1 associates with radiation-induced esophageal toxicity in patients with non-small-cell lung cancer treated with radio(chemo)therapy. *Radiother Oncol.* 2011;101(2):271-7.
168. Yu HM, Liu YF, Cheng YF, Hu LK, Hou M. Effects of rhubarb extract on radiation induced lung toxicity via decreasing transforming growth factor-beta-1 and interleukin-6 in lung cancer patients treated with radiotherapy. *Lung cancer.* 2008;59(2):219-26.
169. Hart JP, Broadwater G, Rabbani Z, Moeller BJ, Clough R, Huang D, et al. Cytokine profiling for prediction of symptomatic radiation-induced lung injury. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2005;63(5):1448-54.

170. Carl C, Flindt A, Hartmann J, Dahlke M, Rades D, Dunst J, et al. Ionizing radiation induces a motile phenotype in human carcinoma cells in vitro through hyperactivation of the TGF-beta signaling pathway. *Cell Mol Life Sci.* 2016;73(2):427-43.
171. Anscher MS. Targeting the TGF-beta1 pathway to prevent normal tissue injury after cancer therapy. *Oncologist.* 2010;15(4):350-9.
172. Anscher MS, Thrasher B, Zgonjanin L, Rabbani ZN, Corbley MJ, Fu K, et al. Small molecular inhibitor of transforming growth factor-beta protects against development of radiation-induced lung injury. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2008;71(3):829-37.
173. Wang S, Campbell J, Stenmark MH, Zhao J, Stanton P, Matuszak MM, et al. Plasma Levels of IL-8 and TGF-beta1 Predict Radiation-Induced Lung Toxicity in Non-Small Cell Lung Cancer: A Validation Study. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2017;98(3):615-21.
174. De Jaeger K, Seppenwoolde Y, Kampinga HH, Boersma LJ, Belderbos JS, Lebesque JV. Significance of plasma transforming growth factor-beta levels in radiotherapy for non-small-cell lung cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2004;58(5):1378-87.
175. Itoh H, Tashima Y. The stress (heat shock) proteins. *Int J Biochem.* 1991;23(11):1185-91.
176. Mosser DD, Morimoto RI. Molecular chaperones and the stress of oncogenesis. *Oncogene.* 2004;23(16):2907-18.

177. Hacker S, Lambers C, Hoetzenecker K, Pollreisz A, Aigner C, Lichtenauer M, et al. Elevated HSP27, HSP70 and HSP90 alpha in chronic obstructive pulmonary disease: markers for immune activation and tissue destruction. Clin Lab. 2009;55(1-2):31-40.

ANEXO i



Servicio Andaluz de Salud
CONSEJERÍA DE SALUD

INFORME DEL COMITÉ DE ÉTICA DE LA INVESTIGACIÓN DE CENTRO H.U. VIRGEN DEL ROCIO

El Comité de Ética de la Investigación de Centro H.U. Virgen del Rocío de Sevilla, en Sesión celebrada el día veintiocho de noviembre de dos mil doce (Acta 10/12):

1. Ha procedido a la revisión del estudio:
 - Código de CEI 2012PI/243
 - Presentado por D. José Luis López Guerra
 - Titulado "Asociación de polimorfismos de nucleótido simple de los genes Tgfb1 y Hspb1 y el riesgo de mortalidad y toxicidad en pacientes con cáncer de pulmón tratados con radio(quimio)terapia". (PI-0096-2012)
2. Tras su valoración procede a emitir **INFORME FAVORABLE** del mismo.

Y para que conste y surta los efectos oportunos se expide la presente certificación en Sevilla, a diez de diciembre de dos mil doce

Fdo.: Fco. Javier Bautista Paloma
Presidente



Hospital Universitario VIRGEN DEL ROCIO
AVDA. MANUEL SIURCO S/N - 41013 - SEVILLA

ANEXO ii



Contents lists available at ScienceDirect

Radiotherapy and Oncology

journal homepage: www.thegreenjournal.com



Original Article

Association of single nucleotide polymorphisms at *HSPB1* rs7459185 and *TGFB1* rs11466353 with radiation esophagitis in lung cancer

Blas David Delgado^{a,1}, María Valle Enguix-Riego^{a,b,1}, Jon Cacicedo Fernández de Bobadilla^c, Daniel Herrero Rivera^d, Jose María Nieto-Guerrero Gómez^e, Juan Manuel Praena-Fernández^f, Eleonor Rivin del Campo^g, María José Ortiz Gordillo^{a,b}, María del Carmen Fernandez Fernandez^{a,b}, Jose Luis Lopez Guerra^{a,b,*}

^a Department of Radiation Oncology, University Hospital Virgen del Rocío; ^b Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBIS/HUVR/CSIC/Universidad de Sevilla), Seville, Spain; ^c Department of Radiation Oncology, Cruces University Hospital, Barakaldo; ^d Department of Medical Oncology, University Hospital Virgen del Rocío, Seville; ^e Department of Radiation Oncology, Ciudad Real; ^f Methodology Unit, University Hospital Virgen del Rocío, Seville, Spain; and ^g Department of Radiation Oncology, Tenon University Hospital, Paris, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 26 July 2018

Received in revised form 10 January 2019

Accepted 7 March 2019

Keywords:

Single nucleotide polymorphisms

*HSPB1**TGFB1*

Radiation esophagitis

Lung cancer

ABSTRACT

Background and purpose: Radiochemotherapy (RCT) success in lung cancer (LC) can be limited due to the onset of adverse effects in the adjacent normal tissue such as radiation-induced esophageal toxicity (RIET). Therefore, specific biomarkers to customize the RCT dose administration and esophageal toxicity prediction are necessary to improve treatment effectiveness.

Materials and methods: 247 LC patients prospectively recruited between 2012 and 2016 from 3 institutions were genotyped for 7 SNPs along *TGFB1* and *HSPB1* genes seeking an association with RIET risk development. Kaplan–Meier cumulative probability and Cox proportional hazards analyses were used to evaluate the effect of *TGFB1* and *HSPB1* genotypes on such risk.

Results: Multivariate analyses showed that patients carrying the *HSPB1* rs7459185 CC genotype were associated with a significantly higher risk of acute grade 3 RIET than those carrying the GG/GC genotypes (HR = 17.73; 95% CI = 2.896–108.49; $p = 0.002$). LC patients who received higher (>median) volume of esophagus exposed to 30 Gy and harboring the rs7459185 GG/GC genotypes showed a significantly lower RIET incidence ($p < 0.001$). Additionally, LC patients carrying the *TGFB1* rs11466353 GG genotype were found to be associated with a lower risk of late grade 2 RIET compared with those with the TT/TG genotypes (HR = 0.29; 95% CI = 0.103–0.830; $p = 0.021$). Patients receiving a high (>60 Gy) radiation dose who presented the rs11466353 GG genotype had a significantly lower RIET incidence ($p = 0.025$).

Conclusion: The presence of different rs7459185/rs11466353 genotypes in LC patients associated with RIET risk and may be useful biomarkers along with other risk factors for guiding therapy intensity in an individualized therapy.

© 2019 Elsevier B.V. All rights reserved. Radiotherapy and Oncology 135 (2019) 161–169

Lung cancer (LC) ranks among the leading causes of death associated with cancer worldwide due to its high incidence and mortality rates. This poses a significant challenge to the health system and a dire economic problem [1]. For advanced (non-metastatic) LC and inoperable cases, radiation therapy (RT) given with chemotherapy is the first-line treatment. RT with curative intention aims to accomplish a beneficial therapeutic index, leading malignant cells to lose their clonogenicity by cell death induction through DNA damage, with the goal of achieving uncomplicated local regional control [2,3]. However, in many cases, the normal

adjacent tissue's radiation tolerance limits the administered radiation dose, thus RT treatment is often accompanied by adverse reactions such as radiation-induced esophageal toxicity (RIET) and radio-induced pneumonitis, affecting treatment efficacy and negatively impairing patient's quality of life [4–6].

RIET can be classified as acute, which usually occurs within 90 days after the completion of treatment and is normally addressed by conservative supportive care, or late, which is more persistent and troublesome with a median onset time of 6 months [7]. The development of different techniques such as three-dimensional conformal radiation therapy, Intensity-Modulated Radiation Therapy (IMRT), Volumetric Modulated Arc Therapy (VMAT), or image-guided radiation therapy (IGRT) has improved the aspects commented above [8,9]. Nevertheless, most patients present acute esophageal toxicity as a response to esophageal

* Corresponding author at: Department of Radiation Oncology, Virgen del Rocío University Hospital, Manuel Siurot avenue, s/n. 41013, Seville Spain.

E-mail address: chanodetrian@yahoo.es (J.L. Lopez Guerra).

¹ The first two authors contributed equally to this work.

<https://doi.org/10.1016/j.radonc.2019.03.005>

0167-8140/© 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.

mucosa irradiation and dosimetric parameters are not enough to predict this event [10]. Therefore, it is necessary to find specific biomarkers to customize the RT dose administration and predict esophageal toxicity, leading to a personalized therapy.

Different molecular events have been described as potentially responsible for radiation-induced normal tissue damage and inter-individual genetic variations appear to be promising biomarkers to discriminate patients with high risks of treatment-related toxicities in different types of cancer [11–14]. Genes within oxidative stress and inflammation signaling networks have being widely studied for their influence to RT response [15,16]. Among them, the Transforming growth factor beta-1 (TGFB-1) plays important roles in inflammation and cell proliferation, which appear to be linked to radiation-induced fibrosis progression [17]. TGFB1 is activated as a feedback anti-inflammatory signal facing the release of cytokines, chemokines and growth factors during the early immune inflammatory response to radiation [18]. Previous studies attempted correlations of different candidate single nucleotide polymorphisms (SNPs) along TGFB1 sequence and increased risk of RIET with the potential of being prognostic and/or predictive biomarkers for clinical practice [19–21]. Additionally, SNPs along Heat shock protein beta-1 (HSPB1) sequence, a chaperone responsible for remediating damage to proteins in response to high levels of stress, inhibition of apoptosis, regulation of cell development, and cell differentiation, have been associated with cellular radiosensitivity in LC patients [22–24].

To explore new planning and treatment technology in RT, SNPs along TGFB1 and HSPB1 might be valuable genetic biomarkers for the identification of patients' individual RIET susceptibility. Consequently, we have performed a multicenter prospective study in 247 LC patients for a better understanding of contributions of different SNPs to predict esophageal radio-sensitivity in LC patients.

Materials and methods

Ethics statement

The study was approved by the Ethics Committee for clinical research and complies with the tenets of the declaration of Helsinki and the Institutional Review Board of the participating centers. Written informed consent for molecular genetic studies was obtained from all participants.

Patient population

Subjects for this prospective analysis were recruited at the radiation oncology department of 3 different institutions between January 2012 and December 2016. Patient selection criteria were as follows: Patients ≥ 18 years old, newly diagnosed stage I-IV patients (undergoing thoracic RT with radical or palliative intent) with small cell, or non-small cell lung cancer were included. Patients presenting lung cancer recurrence were also included if no previous radiation therapy was administered in the first treatment course. The LC cohort consisted of 247 patients, 213 men (86%) and 34 (14%) women (Table 1).

Treatment planning

Patient immobilization and treatment planning were performed with the patient in the supine position. A vacuum sealed cradle for immobilization was made when necessary. All patients were scanned (contrast enhanced computed tomography [CT] scan in 0.5-cm thickness) from the atlas (C1) level to the second lumbar vertebra (L2) level, approximately, to include the whole neck and lungs. In brief, the gross tumor volume (GTV-primary and GTV-node) consisted of the lesion diagnosed by biopsy and therefore

visible in the subsequent CT scan. The regions of tumor visible by endoscopy but not seen on CT images were also included in the GTV-primary. The GTV was expanded by 6–8 mm around the primary tumor and selected lymph node region to obtain a clinical target volume (CTV) which was further expanded laterally and vertically by 10 mm to obtain a planning target volume (PTV). The esophagus was contoured beginning at the level of cricoid cartilage on every CT image, until and including the gastroesophageal junction.

Patient evaluation and follow-up

During the course of radiotherapy, patients were seen at least weekly and more often if they needed clinical evaluation and disease management. They were evaluated at approximately 1–3 months after completion of therapy and then every 3 months. The follow-up evaluations consisted of a history and physical examination. Computerized axial tomography scans were obtained at intervals of 3–6 months. Double-contrast esophagography was performed if clinically indicated.

Genotyping method and SNP selection

Genomic DNA was isolated from peripheral blood sample using the DNeasy® Blood and Tissue kit (Qiagen, Hilden, Germany). DNA concentrations and purity were determined using the NanoDrop 2000 UV-Vis spectrophotometer (Nano Drop Technologies, Wilmington, DE, USA).

Four potentially functional variants of TGFB1 and HSPB1 genes were selected from the gene SNP database of the National Institute of Environmental Health Sciences Genome Program and related literature using the LD TAG SNP Selection tool (<https://snpinfo.niehs.nih.gov/snpinfo/snptag.html>). The selected SNPs met at least two of the following criteria: (1) a minor allele frequency of at least 5%, (2) to be located in the promoter, regulatory or untranslated region of the gene, (3) TaqMan® SNP Genotyping Assay available. Additionally, three previously described SNPs, rs1800469 rs2868371 and rs2868370, associated with RIET development have been selected for validation.

All the genotypes were obtained by real-time polymerase chain reaction on the Viia7 Real Time PCR System (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) using TaqMan® SNP Genotyping Assays (Supplementary Table 1). The general PCR conditions used for the experiments were 60 °C \times 30", [95 °C \times 10', 95 °C \times 15", 60 °C \times 1', 60 °C \times 30"] \times 40.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed using SPSS (version 19.0). The end points of analysis (development of RIET acute and late) were estimated and scored using Common Terminology Criteria for Adverse Events version 4.0. The RT starting point was considered to calculate the time to different RIET development; patients who did not experience the end points were censored at 3 months since RT started or at the time of death or last contact. Kaplan-Meier analysis was performed to estimate the cumulative RIET incidence. Cox proportional hazards analysis was performed to calculate hazard ratio (HR) and confidence interval (CI). Multivariate Cox regression analysis with a stepwise backward elimination procedure was used to adjust for factors significant on univariate analysis, as well as any other factors that might have misled genotypes univariate analysis. A p-value ≤ 0.05 was considered significant. In addition, the pointwise P value was adjusted for multiple testing using a Bonferroni approach by multiplying the pointwise P value by the number of tests.

Table 1
Patient's Characteristics.

Characteristic	No. of Patients (%) n = 247
Gender	
Female	34 (14)
Male	213 (86)
Age (years)	
Median (range)	65 (35–88)
Treatment	
Primary Tumor	195 (79)
Relapse	18 (7.3)
Palliative	34 (13.7)
Smoking status	
Current	126 (51)
Former	111 (45)
Never	10 (4)
N° of cigarettes per day	
Median (range)	30 (3–100)
No. of pack years	
Median (range)	63 (1.5–275.15)
History of dysphagia	
No	234 (94.7)
Yes	13 (5.3)
Loss Weight history	
No	196 (79.3)
Yes	51 (20.7)
KPS	
≥80	187 (75.7)
<80	60 (24.3)
Weight before RT (Kg).	
Median (range)	75 (50–93.3)
Histology	
Squamous cell	102 (41.4)
Adenocarcinoma	69 (28)
Large-cell carcinoma	8 (3.3)
NSCLC, NOS	9 (3.6)
Small-cell carcinoma	57 (23.2)
Sarcoma	1 (0.5)
Primary clinical stage	
I	13 (5.3)
II	12 (4.8)
IIIA	92 (37.2)
IIIB	107 (43.3)
IV	23 (9.4)
Surgery	
No	208 (84.2)
Yes	39 (15.8)
Radiation treatment (days)	
Median (range)	45 (1–127)
Radiation total dose (Gy)	
Median (range)	60 (2–70)
Radiation fractionation	
Once daily	201 (81.4)
Twice daily	19 (18.6)
Concurrent chemoradiation	
No	140 (56.7)
Yes	107 (43.3)
PTV (cc)	
Median (range)	357.22 (23.63–1468.5)
CTV (cc)	
Median (range)	176.22 (7.5–1100)
GTV (cc)	
Median (range)	74.54 (0.98–595.8)
Volume of esophagus (cc)	
Median (range)	28.58 (7–94.43)
D _{min} of esophagus	
Median (range)	0.7 (0.1–15.44)
D _{max} of esophagus, Gy	
Median (range)	61.58 (7.2–75.7)
MED, Gy	
Median (range)	21.9 (0.91–60.14)
Median dose of esophagus	
Median (range)	12.25 (0.29–65.2)
V ₅	
Median (range)	56.625 (1.47–100)

Table 1 (continued)

Characteristic	No. of Patients (%) n = 247
V ₁₀	
Median (range)	51 (0.07–100)
V ₁₅	
Median (range)	47 (0.09–100)
V ₂₀	
Median (range)	43 (0.04–98.4)
V ₂₅	
Median (range)	40 (0.02–97.41)
V ₃₀	
Median (range)	37 (0.02–93.83)
V ₃₅	
Median (range)	32.92 (0.09–92.04)
V ₄₀	
Median (range)	28.07 (0.24–89.23)
V ₄₅	
Median (range)	21.635 (0.09–80)
V ₅₀	
Median (range)	15.37 (0.78–79)
V ₅₅	
Median (range)	9 (0.07–76)
V ₆₀	
Median (range)	4 (0.15–74)
V ₆₅	
Median (range)	2 (0.01–56)
V ₇₀	
Median (range)	0 (0.01–54)

Abbreviations: KPS, Karnofsky Performance Status; NSCLC, NOS, non-small-cell lung cancer, not otherwise specified; D_{min}, minimum dose; D_{max}, maximum dose; MED, mean esophagus dose; V_x, volume of normal esophagus receiving x Gy or more radiation.

* Number of pack years = (packs smoked per day) × (years as a smoker).

SNPs *in silico* analysis

In order to identify functional effects, they were analyzed by RegulomeDB (www.regulomedb.org/), and SNPinfo (FuncPred). Additionally, differential expression analysis was performed using the data from the Genotype-Tissue Expression project (<https://www.gtexportal.org/home/>).

Results

Patient characteristics

The clinical–pathological characteristics of the 247 patients enrolled in the study are listed in Table 1. According to the classification of malignant tumors (TNM) staging system (7th ed), 25 patients (10.1%) were stage I–II, 92 (37.2%) were stage IIIA, 107 (43.4%) were stage IIIB and 23 (9.3%) were stage IV. According to the histopathological classification, there were 69 (28%) adenocarcinoma, 102 (41.3%) squamous-cell carcinoma, 8 (3.2%) large-cell carcinoma, 9 (3.6%) not otherwise specified and 57 (23.4%) small cell carcinoma. Median follow-up time for all patients was 14 months (range, 1 to 88 months). Patients who died or progressed before 3 months from the start of radiation therapy (n = 31) were not included for the late toxicity assessment. At the time of analysis, 141 patients (57%) experienced acute RIET and 28 (13%) late RIET. Irrespective of the treatment modality, the acute grade 2 and 3 rate for all patients was 47% (n = 116), 4.5% (n = 11), respectively, and 8.3% (n = 18) and 1.4% (n = 3) for late RIET, respectively. There was no acute or late grade 4/5 toxicity. Median time between the first day of radiotherapy and the maximum acute RIET of (grade 2 and 3) was 0.7 (range, 0.17–2.90) and 1.6 (range, 0.5–2.03) months, respectively.

Table 2

Associations between patient-, tumor-, and therapy-related characteristics and radiation esophagitis toxicity.

Parameter	Acute Esophagitis (n = 247)						Late Esophagitis (n = 216)					
	Grade 2			Grade 3			Grade 1			Grade 2		
	HR	95% CI	p value	HR	95% CI	p value	HR	95% CI	p value	HR	95% CI	p value
Gender												
Female (ref)	1.00	0.48–1.29	0.342	1.00	0.22–13.62	0.596	1.00	0.15–3.24	0.635	1.00	0.40–22.52	0.286
Male	0.79			1.74			0.69			3.00		
Age, years												
≤65 (ref)	1.00	0.32–0.70	<0.001	1.00	0.19–2.25	0.507	1.00	0.35–4.21	0.756	1.00	0.30–1.98	0.586
>65	0.47			0.66			1.22			0.77		
Treatment												
Primary Tumor (ref)	1.00	0.29–1.34	0.223	1.00	0–845.13	0.533	1.00	0–2254.28	0.569	1.00	0.06–3.67	0.485
Relapse	0.62			0.04			0.04			0.49		
Smoking status												
Former/Never (ref)	1.00	1.08–2.26	0.018	1.00	0.68–9.58	0.168	1.00	0.27–3.26	0.928	1.00	0.37–2.32	0.858
Current	1.56			2.54			0.94			0.92		
No. of cigarettes per day												
≤30 (ref)	1.00	0.75–1.58	0.638	1.00	0.19–2.38	0.537	1.00	0.12–1.98	0.319	1.00	0.57–4.03	0.409
>30	1.09			0.67			0.49			1.51		
No. of packs years ^a												
≤63 (ref)	1.00	0.69–1.46	0.994	1.00	0.30–3.81	0.909	1.00	0.16–2.18	0.426	1.00	0.75–3.26	0.234
>63	1.001			1.08			0.59			1.56		
History of alcoholism												
No (ref)	1.00	0.80–1.82	0.369	1.00	0–20.86	0.277	1.00	0.17–6.67	0.906	1.00	0.61–5.37	0.29
Yes	1.21			0.02			1.11			1.80		
History of dysphagia												
No (ref)	1.00	0.70–3.22	0.301	1.00	0.29–17.76	0.442	1.00	0.31–19.43	0.394	1.00	0.21–11.81	0.669
Yes	1.50			2.25			2.46			1.56		
History of weight loss												
No (ref)	1.00	0.36–0.99	0.045	1.00	0.99–10.63	0.052	1.00	0.22–4.88	0.967	1.00	0.60–4.74	0.326
Yes	0.60			3.24			1.03			1.68		
KPS												
>80 (ref)	1.00	0.50–1.04	0.084	1.00	0.25–2.73	0.764	1.00	0.74–11	0.13	1.00	0.29–1.91	0.531
≤80	0.73			0.83			2.84			0.74		
Weight before RT, Kg												
≤75 (ref)	1.00	0.60–1.32	0.566	1.00	0.36–8.06	0.497	1.00	0.16–2.00	0.375	1.00	0.84–6.32	0.074
>75	0.89			1.71			0.56			6.32	47.71	
Histology												
SCLC (ref)	1.00	0.44–1.01	0.054	1.00	0.23–3.21	0.813	1.00	0.24–5.51	0.866	1.00	0.39–4.80	0.626
NSCLC	0.67			0.85			1.14			1.37		
Clinical Stage												
I–II (ref)	1.00	0.97–4.50	0.058	1.00	0.007–86197	0.446	1.00	0.17–10.45	0.791	1.00	0.35–19.83	0.346
III–IV	2.09			24.12			1.32			2.64		
Surgery												
No (ref)	1.00	0.42–1.25	0.25	1.00	0–35.33	0.347	1.00	0.06–3.64	0.462	1.00	0.11–2.11	0.335
Yes	0.73			0.04			0.46			0.48		
Radiation treatment, days												
≤45 (ref)	1.00	0.60–1.25	0.434	1.00	0.14–1.58	0.217	1.00	0.09–1.29	0.111	1.00	0.77–6.03	0.147
>45	0.87			0.46			0.33			2.15		
Radiation total dose, Gy												
≤60 (ref)	1.00	0.71–1.48	0.89	1.00	0.15–1.79	0.303	1.00	0.16–1.95	0.355	1.00	1.01–9.28	0.049
>60	1.03			0.52			0.55			3.05		
Radiation fractionation												
Once daily (ref)	1.00	2.14–6.25	<0.001	1.00	0–593.39	0.519	1.00	0.14–8.69	0.928	1.00	0.29–5.48	0.759
Twice daily	3.66			0.04			1.10			1.26		
Concurrent CRT												
No (ref)	1.00	1.21–2.53	0.003	1.00	0.87–12.39	0.079	1.00	0.44–5.58	0.482	1.00	0.53–3.42	0.528
Yes	1.75			3.29			1.58			1.35		
PTV, cc ^b	1.001	1.00001–1.001	0.045	1.001	0.99–1.003	0.201	1.00	0.998–1.003	0.816	1.001	0.99–1.003	0.202
CTV, cc ^b	1.001	1.0001–1.002	0.025	1.003	1.000008; 1.005	0.049	0.998	0.99–1.004	0.51	1.001	0.99–1.004	0.556
GTV, cc ^b	1.002	1.0003–1.004	0.021	1.003	0.99–1.01	0.32	1.003	0.997–1.01	0.331	1.00	0.99–1.01	0.957
Volume of esophagus ^b	0.98	0.97–1	0.056	1.026	0.98–1.07	0.274	1.01	0.97–1.06	0.595	1.01	0.97–1.05	0.724
D _{min} of esophagus ^b	1.05	0.98–1.12	0.155	1.057	0.83–1.34	0.65	0.84	0.41–1.73	0.634	1.11	0.97–1.27	0.119
D _{max} of esophagus ^b	1.02	1.004–1.03	0.012	1.022	0.97–1.08	0.397	0.99	0.96–1.03	0.642	1.01	0.98–1.05	0.424
MED ^b	1.03	1.01–1.05	<0.001	1.048	0.99–1.11	0.079	1.003	0.95–1.06	0.925	1.04	0.997–1.08	0.068
Median Dose of esophagus ^b	1.02	1.01–1.03	0.002	1.026	0.99–1.06	0.131	1.02	0.98–1.05	0.35	1.01	0.98–1.04	0.516
V ₅ ^b	1.02	1.01–1.03	0.001	1.02	0.98–1.06	0.292	1.01	0.97–1.05	0.611	1.03	0.999–1.06	0.056
V ₁₀ ^b	1.02	1.01–1.03	0.001	1.02	0.99–1.06	0.218	1.01	0.98–1.05	0.541	1.02	0.99–1.05	0.128
V ₁₅ ^b	1.02	1.01–1.03	<0.001	1.02	0.99–1.06	0.164	1.01	0.98–1.04	0.641	1.01	0.99–1.04	0.286
V ₂₀ ^b	1.02	1.01–1.03	<0.001	1.03	0.997–1.07	0.077	1.003	0.97–1.04	0.822	1.02	0.995–1.05	0.111

Table 2 (continued)

Parameter	Acute Esophagitis (n = 247)						Late Esophagitis (n = 216)					
	Grade 2			Grade 3			Grade 1			Grade 2		
	HR	95% CI	p value	HR	95% CI	p value	HR	95% CI	p value	HR	95% CI	p value
V ₂₅ ^b	1.02	1.01–1.03	<0.001	1.03	0.996–1.07	0.084	1.003	0.97–1.04	0.853	1.02	0.99–1.04	0.179
V ₃₀ ^b	1.02	1.01–1.03	<0.001	1.03	0.998–1.07	0.062	1.003	0.97–1.04	0.849	1.02	0.99–1.04	0.162
V ₃₅ ^b	1.02	1.01–1.03	<0.001	1.03	0.994–1.07	0.101	1.004	0.97–1.04	0.788	1.02	0.995–1.05	0.114
V ₄₀ ^b	1.02	1.01–1.03	<0.001	1.03	0.99–1.06	0.133	1.004	0.97–1.04	0.79	1.02	0.99–1.04	0.132
V ₄₅ ^b	1.02	1.01–1.02	0.003	1.03	0.99–1.06	0.132	1.004	0.97–1.04	0.819	1.01	0.99–1.04	0.284
V ₅₀ ^b	1.01	1.002–1.02	0.019	1.03	0.995–1.06	0.103	1.003	0.97–1.04	0.857	1.02	0.99–1.04	0.236
V ₅₅ ^b	1.01	1.0002–1.02	0.045	1.03	0.999–1.06	0.056	0.994	0.96–1.04	0.782	1.02	0.995–1.05	0.144
V ₆₀ ^b	1.01	0.996–1.02	0.177	1.03	0.996–1.06	0.081	0.995	0.95–1.04	0.812	1.02	0.997–1.05	0.086
V ₆₅ ^b	1.02	0.99–1.03	0.314	1.00	0.94–1.06	0.991	0.96	0.87–1.05	0.361	1.02	0.98–1.05	0.392
V ₇₀ ^b	0.99	0.97–1.02	0.599	1.03	0.97–1.08	0.364	0.971	0.86–1.01	0.644	0.99	0.92–1.06	0.779
rs11466353												
TT/TG (ref)	1.00	0.56–1.94	0.892	1.00	0.101–2.17	0.331	1.00	0.103–2.28	0.360	1.00	0.12–0.91	0.033
GG	1.04			0.47			0.49			0.33		
rs7459185												
GG/GC (ref)	1.00	0.71–2.61	0.346	1.00	1.35–19.15	0.016	1.00	0.15–9.44	0.866	1.00	0.08–4.62	0.635
CC	1.37			5.08			1.19			0.61		
rs2868371												
CC (ref)	1.00	0.73–1.54	0.758	1.00	0.49–4.37	0.489	1.00	0.56–5.29	0.338	1.00	0.23–1.75	0.383
CG/GG	1.06			1.47			1.73			0.64		
rs1800469												
AA (ref)	1.00	0.61–1.43	0.739	1.00	0.27–2.92	0.850	1.00	0.43–11.43	0.345	1.00	0.18–2.51	0.556
AG/GG	0.93			0.89			2.21			0.67		
rs1800468												
CC (ref)	1.00	0.61–1.74	0.902	1.00	0.34–7.33	0.557	1.00	0.59–15.72	0.183	1.00	0.58–5.1	0.332
CT/TT	1.03			1.58			3.05			1.72		
rs11466343												
CC (ref)	1.00	0.44–2.29	0.982	1.00	0.29–18.30	0.435	1.00	0.65–60.41	0.112	1.00	0–293.97	0.490
CT/TT	1.01			2.29			6.28			0.05		
rs2868370												
GG (ref)	1.00	0.54–1.69	0.874	1.00	0.27–13.40	0.525	1.00	0.09–24.18	0.775	1.00	0.57–	0.191
GA/AA	0.96			1.89			1.50			3.11	17.02	

Abbreviations: KPS, Karnofsky performance status; NSCLC, non-small-cell lung carcinoma; SCLC, small-cell lung carcinoma; RT, radiation therapy; CRT, chemoradiation; GTV, gross tumor volume; CTV, clinical target volume; PTV, planning target volume; MED, mean esophagus dose; D_{min} of esophagus, the minimum dose; D_{max} of esophagus, the maximum dose; V(x), volume of normal esophagus receiving X Gy or more radiation.

^a Number of pack years = (packs smoked per day) × (years as a smoker).

^b Dosimetric parameters were analyzed as continuous variables.

Correlation between esophageal toxicity, clinical-pathological characteristics and the selected SNPs

The genotype distributions of *TGFB1* and *HSPB1* SNPs among LC patients are displayed in [Supplementary Table 1](#). Univariate analyses in order to identify associations between patient-, tumor-, and therapy-related characteristics and acute and late RIET are shown in [Table 2](#). Concerning patient characteristics, age, smoking status and weight loss history were found to be associated with grade 2 acute RIET in univariate analysis. The PTV and the GTV were also significantly associated with acute grade 2 esophagitis, whereas CTV was associated with both acute grade 2 and 3 esophagitis. Mean and median esophagus dose (MED) and dosimetric parameters from volume of esophagus (in percent) exposed to 5 Gy (V₅) to V₅₅, were likewise associated with acute RIET grade 2 risk in the univariate analysis. Regarding the type of treatment, radiation fractionation and concurrent radiochemotherapy, were associated with acute grade 2 esophagitis. Concerning late esophageal damage, median time for development after completion of RT was 9 months (3–18 months). Irradiation dose and fractionation were both correlated with grade 2 late RIET. Across the SNP selected for validation, there were no statistically significant connections between the rs2868371 CC genotype and higher risk of acute or late esophagitis (acute grade 2 esophagitis: *p* value = 0.758; acute grade 3 esophagitis: *p* value = 0.489; late grade 1 esophagitis: *p*

value = 0.338; late grade 2 esophagitis: *p* value = 0.383). Identically, rs1800469 AG/AA genotypes previously associated with higher risk of RIET were not statistically significant (acute grade 2 esophagitis: *p* value = 0.739; acute grade 3 esophagitis: *p* value = 0.850; late grade 1 esophagitis: *p* value = 0.345; late grade 2 esophagitis: *p* value = 0.556). Concordant results were obtained related to the rs2868370 previously studied but not associated with RIET (acute grade 2 esophagitis: *p* value = 0.874; acute grade 3 esophagitis: *p* value = 0.525; late grade 1 esophagitis: *p* value = 0.775; late grade 2 esophagitis: *p* value = 0.191).

For the rest of SNPs, patients carrying the rs7459185 CC genotype were associated with a higher risk of acute grade 3 RIET (HR = 5.08; 95% CI = 1.35–19.15; *p* = 0.016). This effect was virtually unchanged when logistic regression model with a stepwise backward elimination procedure of factors associated with acute esophagitis was used (HR = 17.73; 95% CI = 2.896–108.49; *p* = 0.002), suggesting that the association between acute grade 3 esophagitis incidence and rs7459185 CC genotype is an independent factor ([Table 3](#); [Fig. 1](#)). This association was significant after adjustment for multiple testing (*p* = 0.02), assuming a Bonferroni correction. Patients exhibiting rs7459185CC genotype had acute grade 3 RIET rate of 17% (3/18) compared with 4% (8/229) in patients having rs7459185 GG/GC. [Fig. 2A](#) shows the RIET as a function of time according to the rs7459185 SNP and V₃₀. Patients with high (>median) V₃₀ and the rs7459185 GG/GC genotypes had

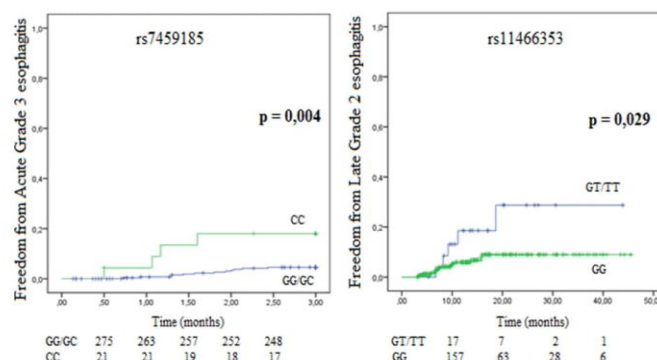
Table 3

Multivariate analysis using a Cox regression model with a stepwise backward elimination procedure of factors associated with acute and late esophagitis.

Parameter	Acute esophagitis			Late esophagitis		
	Grade 2			Grade 2		
	HR	95% CI	p value	HR	95% CI	p value
Age, years						
≤65 (ref)	1.00	0.394–1.007	0.054			
>65	0.63					
KPS						
≤80 (ref)				1.00	1.606–286.12	0.020
>80				21.43		
No. of cigarettes per day						
≤30 (ref)						
>30						
No. of packs years ^a						
≤63 (ref)						
>63						
rs11466353						
TT/TG (ref)				1.00	0.103–0.830	0.021
GG				0.29		
rs7459185						
GG/GC (ref)				1.00	2.896–108.49	0.002
CC				17.73		
Radiation total dose, Gy						
≤60 (ref)				1.00	0.945–8.920	0.063
>60				2.90		
Radiation fractionation						
Once daily (ref)	1.00	1.604–5.067	<0.001			
Twice daily	2.85					
V ₂₀	1.02	1.019–1.006	0.003			
V ₃₀				1.04	0.993–1.087	0.097

Abbreviations: KPS, Karnofsky Performance Status; V(x), volume of normal esophagus receiving x Gy or more radiation.

Bold value indicates a statistically significant difference with a p-value less than 0.05

^a Number of pack years = (packs smoked per day) × (years as a smoker).**Fig. 1.** Kaplan-Meier curve for acute grade 3 and late grade 2 radiation-induced esophagitis in lung cancer patients carrying different rs7459185 and rs11466353 genotypes.

a significantly lower RIET incidence ($p < 0.001$) compared with patients carrying the CC genotype.

Additionally, LC patients with the rs11466353 GG genotype showed an association with a lower risk of late grade 2 RIET development (HR = 0.33; 95% CI = 0.12–0.91; $p = 0.033$) which was further unchanged in multivariate analyses (HR = 0.29; 95% CI = 0.103–0.830; $p = 0.021$) (Table 3; Fig. 1). This association was not significant after adjustment for multiple testing ($p = 0.105$), assuming a Bonferroni correction. Patients harboring the rs11466353 TT/TG genotypes exhibit a late grade 2 RIET rate of 23% (5/21) compared with 7% (13/196) in patients with rs11466353 GG genotype. Fig. 2B shows the RIET as a function of time according to the rs11466353 SNP and the delivered radiation dose. Patients receiving high (>60 Gy) radiation doses and the rs11466353 GG genotype had a significantly lower RIET incidence

($p = 0.025$) compared with patients carrying the TT/TG genotypes. Eventually, no statistical significant association was found for the rest of SNPs analyzed linked to RIET risk development.

The SNPs were also analyzed according lung cancer subtypes. For patients with adenocarcinoma ($N = 69$), only the rs7459185 SNP showed a significant association with acute grade 2 radiation esophagitis (HR: 3.34; 95% CI 1.16–9.59; $p = 0.025$). Patients exhibiting rs7459185CC genotype had acute grade 2 RIET rate of 100% (4/4) compared with 51% (33/65) in patients having rs7459185 GG/GC. For patients with squamous cell carcinoma ($N = 102$), only the rs11466353 SNP showed an association with acute grade 3 (HR: 0.12; 95% CI 0.02–0.99; $p = 0.049$) and late grade 1 (HR: 0.13; 95% CI 0.10–0.86; $p = 0.025$) RIET. Patients harboring the rs11466353 TT/TG genotypes exhibit an acute grade 3 and late grade 1 RIET rate of 18% (2/11) and 20% (2/10) compared with 2%

B.D. Delgado et al. / Radiotherapy and Oncology 135 (2019) 161–169

167

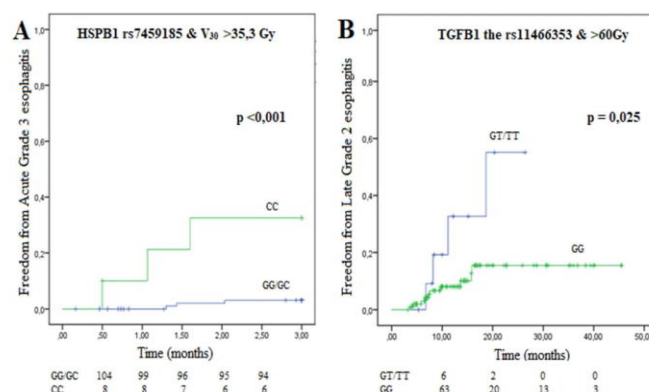


Fig. 2. Kaplan-Meier curve for: (A) the effect of the rs7459185 genotypes in lung cancer patients receiving high (>median) V_{30} on the cumulative incidence of acute grade 3 radiation-induced esophagitis; and (B) the effect of the rs11466353 genotypes in lung cancer patients receiving high (>median) radiation doses on the cumulative incidence of late grade 2 radiation-induced esophagitis.

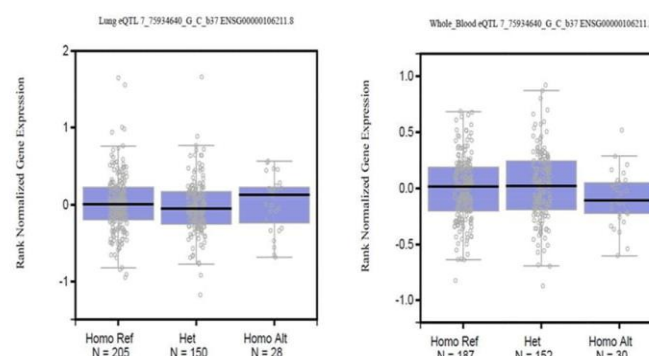


Fig. 3. Expression quantitative trait loci analysis of HSPB1 in the presence of the three different rs7459185 genotypes using data from the Genotype-Tissue Expression project.

(2/91) and 3% (2/78), respectively, in patients with rs11466353 GG genotype. For those cases with small-cell carcinoma ($N = 57$), there was not any statistical significant association.

The SNP rs7459185 is a downstream gene variant located in the chromosomal position chr7:76305323 (Supplementary Fig. 1). To provide biologically plausible support to the association and the prediction obtained, rs7459185 different genotypes and HSPB1 mRNA expression patterns were evaluated by expression quantitative trait loci analysis using lung tissue and blood cells expression data from the Genotype-Tissue Expression Database. The results showed a decrease in the HSPB1 mRNA expression levels in the presence of the rs7459185 CC genotype; while there were no evident changes between HSPB1 mRNA expression levels between different genotypes in case of lung tissue (Fig. 3).

Discussion

Over half of all LC patients are currently treated with RT; however the treatment is sometimes severely limited by the need to constrain the dose to the surrounding normal tissues in order to preserve their function. Esophageal toxicity caused by RT is a real and potentially debilitating toxicity which is estimated to be mainly caused by patient-related factors.

In the present study, half of patients suffered from acute esophagitis grade 2 or 3, which implies a complication that may require invasive treatments and delay the systemic therapies, despite a relatively homogeneous treatment. This common event has been previously explained as a result of the general concomitant platinum-based chemotherapy used in LC treatment due to radio-sensitizing nature of these agents [25–27]. Concurrent chemoradiation was associated with grade 2 acute esophagitis in univariate analysis but not for grade 3, much more severe and life-threatening in some cases, requiring enteral or parenteral nutrition. Therefore, concurrent chemoradiotherapy might not answer the more severe cases of toxicity nor explain the variability of the normal tissue response.

Alternatively, dosimetric factors such as the volume of the esophagus in percentage that receives a certain irradiation dose (Gy) as well as esophagus delineation might be suitable predictive dosimetric factors for esophagitis. Escalating the radiation therapy dose seems to increase toxicity risk development, especially when chemotherapy is concomitantly administered. Higher radiation therapy doses with concurrent chemotherapy result in poorer survival, partially due to the high levels of toxicity, which suggests that the optimal radiation dose has yet to be reached [28].

As a non-invasive alternative for molecular diagnosis and treatment monitoring we propose the association study between 7

SNPs, 2 previously described to be linked to RIET risk development (rs1800469 and rs2868371). Firstly, we did not find evidence of associations between the rs1800469, and rs2868371 in our cohort. The connection between the rs1800469 GA/AA genotypes was tested in early-grade RIET in a Chinese population [19], and next confirmed in an American study which also associated the presence of those genotypes with grade 3 toxicity [20]. Marked differences in cancer occurrence and treatment response may be markers of differences in genetic susceptibility. The SNP distribution is well known to differ among ethnicities and somehow polymorphic alleles can be under negative or positive selection in a population. The rs1800469 genotyping distribution is substantially different compared to the one found in our population. Relating to rs2868371, a previous American study linked a higher risk of grade 3 RIET with homozygosity for the most common allele C [24], with a very similar genotyping distribution compared to ours. Nevertheless, ethnic background should be carefully considered and some bias might affect those previous results owing to the small size and single-institution population analyzed.

Regarding the non-previously described SNP analyzed, the results obtained showed that patients carrying the rs7459185 CC genotype located in *HSPB1* sequence present a significantly higher risk of acute RIET while LC patient's harboring the rs11466353 TT/TG genotypes are associated with a higher susceptibility for late RIET development. The association between these genotypes and higher esophagitis risk resulted independent of other clinical-pathological and treatment factors although the SNP rs11466353 association did not retained statistical significance after Bonferroni correction. Interestingly, only the rs7459185 SNP showed a significant association with RIET when analyzing adenocarcinoma cases and only the rs11466353 SNP showed an association with RIET for patients with squamous cell carcinoma. We acknowledge that the distribution of cases across histological subtypes in our series is not representative in the clinical setting, where there is usually much more adenocarcinoma than squamous cell carcinomas. These SNPs are within the *TGFB1* and *HSPB1* sequences, which are widely-known for their role in RT clinical response and have been previously subjected as radiation tolerance biomarkers [29–31].

On one hand, *TGFB1* has been well-established to be associated with radiation induced inflammation as a master switch for fibrosis development and persistence [17,32,33]. Moreover, ionizing radiation induces *TGFB1* release, and overall the literature suggests plasma *TGFB1* levels for its potential value to predict toxicities in LC [34,35]. However, *TGFB1* plasma measurement is challenging because of its reproducibility, whereas DNA is more stable and easily testable, giving the opportunity to individualize treatment. Thus the use of associated *TGFB1* SNPs as biomarkers is notably convenient. The significant statistical association between the rs11466353 TT genotype and late esophagitis merely might be a prognostic biomarker and play an important role in the clinical outcomes of LC patients. Nonetheless, to test the rs11466353 intronic variant regulatory potential role *in silico* resulted in a struggle due to the little data available, thus the molecular mechanisms for the observed connection should be further investigated.

On the other hand, the rise of the rs7459185 CC genotype within *HSPB1* gene was linked to the risk of acute grade 3 esophagitis in LC patients. Bioinformatics' analysis showed a decrease in *HSPB1* mRNA expression levels in the presence of the rs7459185 CC risk genotype. *HSPB1* is also well-known for its function in stress-induced cellular damage prevention and protein stability, being strongly induced by different stressors, including ionizing radiation [36–38]. In this regard, high *HSPB1* expression levels enhance the antioxidant capacity of ionizing radiation. Therefore, a *HSPB1* down-regulation triggered by the rs7459185 C risk allele may increase cell sensitivity to RT, promoting RIET,

which may partly explain the underlying biological mechanisms of the observed associations, although this hypothesis needs to be confirmed.

In conclusion, we were able to identify genetic variants associated with the development of short- and long-term side effects of RT. To our knowledge, this is the first evidence that the presence of different genotypes of both SNPs (rs7459185/rs11466353) associate with acute or late RIET risk, respectively. Together with radiation dosimetric and other risk factors, the genetic test performed in the current analysis might be useful as biomarker in the prescription of personalized RT.

Acknowledgements

This work was supported by grants from Instituto de Salud Carlos III (PI13/01155, PI16/02104) and Consejería de Salud of the Junta de Andalucía (PI-0096-2012), Spain.

Conflicts of interest

None.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.radonc.2019.03.005>.

References

- [1] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2017. *CA Cancer J Clin* 2017;67:7–30. <https://doi.org/10.3322/caac.21387>.
- [2] Toulany M, Rodemann HP. Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling as a key mediator of tumor cell responsiveness to radiation. *Semin Cancer Biol* 2015;35:180–90. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2015.07.003>.
- [3] Willers H, Azzoli CG, Santivasi WL, Xia F. Basic mechanisms of therapeutic resistance to radiation and chemotherapy in lung cancer. *Cancer J* 2013;19:200–7.
- [4] Mehta V. Radiation pneumonitis and pulmonary fibrosis in non-small-cell lung cancer: pulmonary function, prediction, and prevention. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2005;63:5–24. <https://doi.org/10.1097/PP0.0b013e318292e4e3>.
- [5] Dholaria B, Dang S, Arnaoutakis K, Hardee M. Chapter 7: Gastrointestinal side effects of palliative radiation therapy delivered via advanced technologies. In: Fairchild A, editor. *Palliative Radiation Therapy: Utilization of Advanced Technologies*, Vol. 2. New York, NY: Nova Science Publishers Inc; 2015. p. 125–52.
- [6] Huang EX, Bradley JD, El Naqa I, Hope AJ, Lindsay PE, Bosch WR, et al. Modeling the risk of radiation-induced acute esophagitis for combined Washington University and RTOG trial 93–11 lung cancer patients. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2012;82:1674–9. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2011.02.052>.
- [7] Werner-Wasik M. Treatment-related esophagitis. *Semin Oncol* 2005;32:S60–6.
- [8] Werner-Wasik M, Paulus R, Curran Jr WJ, Byhardt R. Acute esophagitis and late lung toxicity in concurrent chemoradiotherapy trials in patients with locally advanced non-small-cell lung cancer: analysis of the radiation therapy oncology group (RTOG) database. *Clin Lung Cancer* 2011;12:245–51. <https://doi.org/10.1016/j.clcl.2011.03.026>.
- [9] Glatzer M, Elicin O, Ramella S, Nestle U, Putora PM. Radio(chemo)therapy in locally advanced non-small cell lung cancer. *Eur Respir Rev* 2016;25:65–70. <https://doi.org/10.1183/160006617.0053-2015>.
- [10] Marks LB, Bentzen SM, Deasy JO, Kong FM, Bradley JD, Vogelius IS, et al. Radiation dose-volume effects in the lung. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2010;76:S70–6. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2009.06.091>.
- [11] Chen Y, Zhu M, Zhang Z, Jiang G, Fu X, Fan M, et al. A NEIL1 single nucleotide polymorphism (rs4462560) predicts the risk of radiation-induced toxicities in esophageal cancer patients treated with definitive radiotherapy. *Cancer* 2013;119:4205–11. <https://doi.org/10.1002/cncr.28338>.
- [12] Fachal L, Gómez-Caamaño A, Peleteiro P, Carballo A, Calvo-Crespo P, Sánchez-García M, et al. Association of a XRCC3 polymorphism and rectum mean dose with the risk of acute radio-induced gastrointestinal toxicity in prostate cancer patients. *Radiother Oncol* 2012;105:321–8. <https://doi.org/10.1016/j.radonc.2012.09.013>.
- [13] Andreassen CN, Alsner J. Genetic variants and normal tissue toxicity after radiotherapy: a systematic review. *Radiother Oncol* 2009;92:299–309.
- [14] West CM, Elliott RM, Burnet NG. The genomics revolution and radiotherapy. *Clin Oncol* 2007;19:470–80. <https://doi.org/10.1016/j.radonc.2009.06.015>.
- [15] Kerns SL, Ostrer H, Rosenstein BS. Radiogenomics: using genetics to identify cancer patients at risk for development of adverse effects following

- radiotherapy. *Cancer Discov* 2014;4:155–65. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-13-0197>.
- [16] Guo Z, Shu Y, Zhou H, Zhang W, Wang H. Radiogenomics helps to achieve personalized therapy by evaluating patient responses to radiation treatment. *Carcinogenesis* 2015;36:307–17. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgv007>.
 - [17] Anscher MS. Targeting the TGF-beta1 pathway to prevent normal tissue injury after cancer therapy. *Oncologist* 2010;15:350–9. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2009-S101>.
 - [18] Kang HR, Cho SJ, Lee CG, Homer RJ, Elias JA. Transforming growth factor (TGF)-beta1 stimulates pulmonary fibrosis and inflammation via a Bax-dependent, bid-activated pathway that involves matrix metalloproteinase-12. *J Biol Chem* 2007;282:7723–32.
 - [19] Zhang L, Yang M, Bi N, Ji W, Wu C, Tan W, et al. Association of TGF-β1 and XPD polymorphisms with severe acute radiation-induced esophageal toxicity in locally advanced lung cancer patients treated with radiotherapy. *Radiother Oncol* 2010;97:19–25. <https://doi.org/10.1016/j.radonc.2010.08.015>.
 - [20] Guerra JL, Gomez D, Wei Q, Liu Z, Wang LE, Yuan X, et al. Association between single nucleotide polymorphisms of the transforming growth factor β1 gene and the risk of severe radiation esophagitis in patients with lung cancer. *Radiother Oncol* 2012;105:299–304. <https://doi.org/10.1016/j.radonc.2012.08.014>.
 - [21] Yuan ST, Ellingrod VL, Schipper M, Stringer KA, Cai X, Hayman JA, et al. Genetic variations in TGFβ1, tPA, and ACE and radiation-induced thoracic toxicities in patients with non-small-cell lung cancer. *Thorac Oncol* 2013;8:208–13. <https://doi.org/10.1097/JTO.0b013e318274592e>.
 - [22] Guisasaola MC, Calvo F, Marcos P, Simón I, Villanueva FJ, Andrés E, et al. Peripheral leukocyte response to oncological radiotherapy: expression of heat shock proteins. *Int J Radiat Biol* 2006;82:171–9.
 - [23] Pang Q, Wei Q, Xu T, Yuan X, Lopez Guerra JL, Levy LB, et al. Functional promoter variant rs2868371 of HSPB1 is associated with risk of radiation pneumonitis after chemoradiation for non-small cell lung cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2013;85:1332–9. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2012.10.011>.
 - [24] Lopez Guerra JL, Wei Q, Yuan X, Gomez D, Liu Z, Zhuang Y, et al. Functional promoter rs2868371 variant of HSPB1 associates with radiation-induced esophageal toxicity in patients with non-small-cell lung cancer treated with radio (chemo) therapy. *Radiother Oncol* 2011;101(2):271–7. <https://doi.org/10.1016/j.radonc.2011.08.039>.
 - [25] Qiao WB, Zhao YH, Zhao YB, Wang RZ. Clinical and dosimetric factors of radiation-induced esophageal injury: radiation-induced esophageal toxicity. *World J Gastroenterol* 2005;11:2626–9.
 - [26] Belderbos J, Heembergen W, Hoogeman M, Pengel K, Rossi M, Lebesque J. Acute esophageal toxicity in non-small cell lung cancer patients after high dose conformal radiotherapy. *Radiother Oncol* 2005;75:157–64.
 - [27] Singh AK, Lockett MA, Bradley JD. Predictors of radiation-induced esophageal toxicity in patients with non-small-cell lung cancer treated with three-dimensional conformal radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2003;55:337–41.
 - [28] Ramroth J, Cutter DJ, Darby SC, Higgins GS, McGale P, Partridge M, et al. Dose and fractionation in radiation therapy of curative intent for non-small cell lung cancer: meta-analysis of randomized trials. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2016;96:736–47. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2016.07.022>.
 - [29] Zhao L, Sheldon K, Chen M, Yin MS, Hayman JA, Kalemkerian GP, et al. The predictive role of plasma TGF-beta1 during radiation therapy for radiation-induced lung toxicity deserves further study in patients with non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2008;59:232–9.
 - [30] Yu HM, Liu YF, Cheng YF, Hu LK, Hou M. Effects of rhubarb extract on radiation induced lung toxicity via decreasing transforming growth factor-beta-1 and interleukin-6 in lung cancer patients treated with radiotherapy. *Lung Cancer* 2008;59:219–26.
 - [31] Hart JP, Broadwater G, Rabbani Z, Moeller BJ, Clough R, Huang D, et al. Cytokine profiling for prediction of symptomatic radiation-induced lung injury. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2005;63:1448–54.
 - [32] Carl C, Flindt A, Hartmann J, Dahlke M, Rades D, Dunst J, et al. Ionizing radiation induces a motile phenotype in human carcinoma cells in vitro through hyperactivation of the TGF-beta signaling pathway. *Cell Mol Life Sci* 2016;73:427–43. <https://doi.org/10.1007/s00018-015-2003-2>.
 - [33] Anscher MS, Thrasher B, Zgonjanin L, Rabbani ZN, Corbly MJ, Fu K, et al. Small molecular inhibitor of transforming growth factor-beta protects against development of radiation-induced lung injury. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2008;71:829–37. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2008.02.046>.
 - [34] Wang S, Campbell J, Stenmark MH, Zhao J, Stanton P, Matuszak MM, et al. Plasma levels of IL-8 and TGF-β1 predict radiation-induced lung toxicity in non-small cell lung cancer: a validation study. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2017;98:615–21. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2017.03.011>.
 - [35] De Jaeger K, Seppenwoolde Y, Kampinga HH, Boersma LJ, Belderbos JS, Lebesque JV. Significance of plasma transforming growth factor-beta levels in radiotherapy for non-small-cell lung cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2004;58:1378–87.
 - [36] Itoh H, Tashima Y. The stress (heat shock) proteins. *Int J Biochem* 1991;23:1185–91.
 - [37] Mosser DD, Morimoto RI. Molecular chaperones and the stress of oncogenesis. *Oncogene* 2004;23:2907–18.
 - [38] Hacker S, Lambers C, Hoetenecker K, Pollreis A, Aigner C, Lichtenauer M, et al. Elevated HSP27, HSP70 and HSP90α in chronic obstructive pulmonary disease: markers for immune activation and tissue destruction. *Clin Lab* 2009;55:31–40.

